

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

CO-ESTIMULAÇÃO DE LINFÓCITOS B E AUTO-IMUNIDADE.

**UM ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DE
CD40, BLYS E CD19 E O PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof^a Maria Luiza Petzl-Erler, pela dedicação, ensinamentos e exemplo;

Aos meus pais e todos os demais familiares pela torcida, pelo carinho, pelo incentivo a cada momento de desânimo e compreensão dos longos períodos de ausência;

Às Professoras Eleidi, Regina Célia e Graça, pela dedicação e leitura crítica desse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana: Marcinha, Karen, Karin, Rodrigo, Márcia, Rafaela, Cinthia e Letícia, pela convivência harmoniosa e prazerosa do dia-a-dia e pelo compartilhamento e incentivo em todos os momentos de desespero, angústia, alegria, prazer e satisfação que fizeram parte deste trabalho;

Aos amigos do Departamento de Genética, por todas as festas.....e em especial às mentoras de todas elas: Anilda e Valéria.....muita saúde e ânimo às duas!

Aos professores do Departamento de Genética, por todos os ensinamentos e estímulo;

À Dona Izolde, pelo carinho e por todos os cafezinhos;

Ao meu namorado, Ives, pelo convívio, pela compreensão, pela dedicação, pela torcida, pelo companheirismo, por me fazer feliz a cada dia.....pelo amor.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.
Albert Einstein (1879 - 1955)

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 DOENÇAS COMPLEXAS	3
2.2 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO (PFE).....	5
2.2.1 <i>Formas clínicas</i>	5
2.2.2 <i>Epidemiologia</i>	6
2.2.3 <i>Imunopatologia</i>	8
2.2.4 <i>Histopatologia</i>	10
2.2.5 <i>Tratamento</i>	11
2.2.6 <i>Pênfigo como doença complexa - Genética e Ambiente</i>	12
2.3 TOLERÂNCIA E QUEBRA DA TOLERÂNCIA AO PRÓPRIO.....	16
2.4 GENES CANDIDATOS	18
2.4.1 <i>CD40, o gene que codifica uma molécula essencial para o desenvolvimento de células B</i>	18
2.4.1.1. INTERAÇÃO CD40-CD40L EM DOENÇAS AUTO-IMUNES	21
2.4.1.2 POLIMORFISMOS EM CD40 E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO.....	23
2.4.2 <i>BLYS, o gene que codifica a molécula estimuladora de linfócitos B</i>	24
2.4.2.1 POLIMORFISMOS EM BLYS E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO	29
2.4.3. <i>CD19, o gene que codifica uma molécula crítica na manutenção da tolerância periférica</i>	31
2.4.3.1 POLIMORFISMOS EM CD19 E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO.....	33
2.4.4. <i>Relacionamento funcional entre as moléculas CD40, BLYS e CD19</i>	34
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL	39
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	44
4.3. TIPAGENS GÊNICAS	44
4.3.1. <i>Genotipagem de CD40 -1(C,T)</i>	44
4.3.2 <i>Genotipagem de BLYS</i>	46
4.3.2.1. SNP -871(C,T).....	46
4.3.3.2. SNP 313(G,A).....	47
4.3.4 <i>Genotipagem de CD19</i>	49
4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS	56
5.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE CD40 -1(C,T)	56
5.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE BLYS	60
5.2.1 <i>Análise de Associação Individual de BLYS -871(C,T)</i>	60
5.2.2 <i>Análise de BLYS 313(G,A)</i>	64
5.3.. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE CD19 -30(C,T)	64
5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE INTERAÇÃO GÊNICA	69
5.4.1 <i>Análises de interação entre os genes BLYS e CD40</i>	69

5.4.2	<i>Análises de interação entre os genes BLYS e CD19</i>	74
5.4.3	<i>Análises de interação entre os genes CD40 e CD19</i>	74
5.4.4	<i>Análises de interação entre o gene IL4 e os genes BLYS, CD40 e CD19</i>	77
5.4.5	<i>Análises de interação entre o gene IL6 e os genes BLYS, CD40 e CD19</i>	77
5.4.6	<i>Análises de Interação entre o Gene HLA-DRB1 e os Genes BLYS, CD40 e CD19</i>	77
6	DISCUSSÃO	78
6.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA	78
6.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DOS GENES CD40, BLYS E CD19 COM O PFE	79
6.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE BLYS 313(G,A)	83
6.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE INTERAÇÃO ENTRE OS GENES CD40, BLYS E CD19 NA MODULAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AO PFE	84
6.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE INTERAÇÃO ENTRE OS GENES IL4, IL6 E HLA-DRB1 E OS GENES BLYS, CD40 E CD19	87
6.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7	CONCLUSÕES	89
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1	- FREQUÊNCIAS DAS QUATRO COMBINAÇÕES FENOTÍPICAS PARA OS DOIS GENES ANALISADOS (FATOR A E FATOR B), COM RELAÇÃO À PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DETERMINADA POSIÇÃO VARIÁVEL.....	52
TABELA 4.2	- MODELO DAS TABELAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E PORTADORES DE DETERMINADO ALELO.....	53
TABELA 4.3	- MODELO DE TABELA UTILIZADA PARA ANALISAR O POSSÍVEL EFEITO DO FENÓTIPO DO FATOR B (VARIANTES DOS GENES <i>CD40</i> , <i>BLYS</i> E <i>CD19</i>) NA AMOSTRA ESTRATIFICADA PARA OS FENÓTIPOS DE HLA-DRB1.....	54
TABELA 4.4	- MODELO DAS TABELAS DE CONTINGÊNCIA PARA COMPARAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS A RESPEITO DAS POSSÍVEIS FORMAS DE INTERAÇÃO GÊNICA, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	54
TABELA 5.1.1-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>CD40</i> -1(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	57
TABELA 5.1.2-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>CD40</i> -1(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	58
TABELA 5.1.3-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE <i>CD40</i> -1 ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	59
TABELA 5.2.1-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>BLYS</i> -871(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	61
TABELA 5.2.2	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>BLYS</i> -871(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUB-GRUPOS-POPULACIONAIS.....	62
TABELA 5.2.3-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE <i>BLYS</i> -871 ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	63
TABELA 5.3.1-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>CD19</i> -30(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUB-GRUPOS POPULACIONAIS.....	66
TABELA 5.3.2-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE <i>CD19</i> -30(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUB-GRUPOS POPULACIONAIS.....	67
TABELA 5.3.3-	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE <i>CD19</i> -30 ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.....	68
TABELA 5.4	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E DE PORTADORES DE C+C- PARA OS GENES <i>BLYS</i> E <i>CD40</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	71

TABELA 5.5	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E DE PORTADORES DE TODAS AS DEMAIS COMBINAÇÕES PARA OS GENES <i>BLYS</i> E <i>CD40</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	71
TABELA 5.6	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ E DE PORTADORES DE TODAS AS DEMAIS COMBINAÇÕES, PARA OS GENES <i>BLYS</i> E <i>CD40</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	72
TABELA 5.7	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ E DE PORTADORES DE T+T-, PARA OS GENES <i>BLYS</i> E <i>CD40</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	72
TABELA 5.8	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C/T - T+ E PORTADORES DE C/T - T-, PARA OS GENES <i>BLYS</i> E <i>CD40</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	73
TABELA 5.9	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E PORTADORES DE C+T- PARA OS GENES <i>CD40</i> E <i>CD19</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	75
TABELA 5.10	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E PORTADORES DE TODAS AS OUTRAS COMBINAÇÕES POSSÍVEIS PARA OS GENES <i>CD40</i> E <i>CD19</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	75
TABELA 5.11	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+C+ E PORTADORES DE T-C- PARA OS GENES <i>CD40</i> E <i>CD19</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	76
TABELA 5.12	- COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ DE TODAS AS OUTRAS COMBINAÇÕES PARA OS GENES <i>CD40</i> E <i>CD19</i> , ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	76
TABELA 6.1	- RESUMO DOS EFEITOS FENOTÍPICOS DAS COMBINAÇÕES DOS GENES <i>CD40</i> , <i>BLYS</i> E <i>CD19</i> SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE AO PFE.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.2-	LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO (FOTOS CEDIDAS PELO DOUTOR JESUS SANTAMARIA).....	8
FIGURA 2.3 -	MODELO DA VIA IMUNOPATOGENICA DO PFE.....	13
FIGURA 2.4 -	COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS NECESSÁRIOS PARA ATIVAR UMA CÉLULA B E UMA CÉLULA T CD4 ⁺	20
FIGURA 2.4.1 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE <i>CD40</i> E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS.....	24
FIGURA 2.4.2 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE <i>BLYS</i> E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS.....	31
FIGURA 2.4.3 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE <i>CD19</i> E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS.....	34
FIGURA 2.4.4-	ESQUEMA PROPOSTO PARA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B NOS CENTROS GERMINATIVOS.....	36
FIGURA 4.1-	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS REGIÕES DO TERRITÓRIO BRASILEIRO NAS QUAIS OCORREU INÍCIO DE MANIFESTAÇÃO DAS LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PFE.....	41
FIGURA 4.2 -	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS ATIVIDADES OCUPACIONAIS EM PACIENTES E CONTROLES	41
FIGURA 4.3 -	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO GRAU DE INSTRUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES.....	42
FIGURA 4.4-	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA FAIXA ETÁRIA NA QUAL HOVE O APARECIMENTO DA LESÃO CARACTERÍSTICA DO PFE	43
FIGURA 4.5 -	DISTRIBUIÇÃO SEXUAL ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	43
FIGURA 4.3.1 -	(A) LOCALIZAÇÃO DO SNP -1C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM O ALELO C E O SÍTIO MONOMÓRFICO SÃO CLIVADOS PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO TRÊS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C).....	45
FIGURA 4.3.2 -	(A) LOCALIZAÇÃO DO SNP -871C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM ALELO C É CLIVADO PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO DOIS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C).....	47
FIGURA 4.3.3 -	GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO O PADRÃO DE BANDAS OBTIDO POR MEIO DA TÉCNICA DE SSCA, PARA <i>BLYS</i> 313(G/A). DUAS BANDAS REPRESENTAM OS HOMOZIGOTOS G/G E QUATRO BANDAS OS HETEROZIGOTOS G/A.....	48
FIGURA 4.3.4 -	(A) LOCALIZAÇÃO DO SNP -30C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM O ALELO C É CLIVADO PELA	

ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO DOIS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C).....	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Amostra populacional de origem predominantemente africana
APC	Célula apresentadora de antígenos
AR	Artrite reumatóide
BCR	Receptor de linfócito B
DG	Doença de Graves
DSG1	Desmogleína 1
EU	Amostra populacional de origem predominantemente européia
FDC	Células dendríticas foliculares
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
OR	Razão de probabilidades
PF	Pênfigo foliáceo
PFE	Pênfigo foliáceo endêmico
PPN	Pênfigo paraneoplásico
PV	Pênfigo vulgar
RNA _m	RNA mensageiro
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TCR	Receptor de linfócito T

RESUMO

O pênfigo foliáceo endêmico (PFE) é uma doença auto-imune complexa caracterizada por bolhas intra-epidérmicas e pela presença de anticorpos contra a desmogleína 1. A auto-imunidade resulta em perda de adesão entre os queratinócitos, um processo denominado acantólise. As interações das moléculas CD40, BLYS e CD19 com seus receptores, desencadeiam sinais intracelulares co-estimuladores de células B, tendo papel fundamental na regulação e manutenção da tolerância central e periférica. Níveis alterados dessas moléculas já foram correlacionados com vários distúrbios auto-imunes. Em algumas dessas doenças esses níveis alterados foram correlacionados com polimorfismos nos genes que codificam estas moléculas. Este trabalho destina-se a investigar, por meio de um estudo de associação caso-controle, se polimorfismos genéticos dessas moléculas podem conferir maior susceptibilidade ou resistência ao PFE. Além disso, tentou-se analisar possíveis efeitos de interação gênica sobre a susceptibilidade à doença, entre os genes em estudo entre si e desses com genes previamente analisados, para os quais já haviam sido identificadas associações com o PFE (*IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1*). Foram analisados 147 pacientes e 290 indivíduos-controle. Não foram encontradas associações de variantes alélicas ou genóticas de *CD40*, *BLYS* e *CD19* com o PFE. Também não foram identificadas interações entre os genes *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1* e os genes *CD40*, *BLYS* e *CD19*. Associações negativas foram encontradas ao analisarem-se genótipos compostos de *BLYS* -871 e *CD40* -1: indivíduos portadores do alelo C em *BLYS* e T em *CD40* (OR = 0,52 e 0,56), portadores de T em *BLYS* e T em *CD40* (OR = 0,47 e 0,45) e portadores do genótipo C/T em *BLYS* e do alelo T em *CD40* (OR = 0,33), são mais resistentes à doença. Já ao analisarem-se os genótipos compostos de *CD40* -1 e *CD19* -30, foram encontradas associações positivas com as seguintes combinações: indivíduos portadores do alelo C em *CD40* e T em *CD19* (OR = 3,85 e 3,0) e indivíduos portadores do genótipo C/C em *CD40* e do alelo T em *CD19* (OR = 2,07), são mais susceptíveis à doença. Os resultados dessas análises de interação gênica foram interpretados com cautela, pois não foram aplicadas correções estatísticas aos valores de *P*. Os resultados desse estudo levam-nos a concluir que a variabilidade analisada não influencia, de forma expressiva, o desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico. Sugere-se que o possível efeito dos genótipos compostos de *CD40* e *BLYS*, como os de *CD40* e *CD19*, sobre a susceptibilidade/resistência ao PFE sejam investigadas de forma mais detalhada em estudos posteriores, utilizando-se amostras maiores de pacientes e controles.

1 INTRODUÇÃO

Doenças auto-imunes são, em geral, patologias multifatoriais que decorrem de fatores genéticos e ambientais. Há evidências convincentes de que a susceptibilidade genética é complexa para a maioria dessas doenças, mediada por vários genes polimórficos, nenhum sendo suficiente ou requerido para que a doença ocorra, e que a interação de vários alelos pode acentuar ou atenuar a susceptibilidade à doença. Seguindo este modelo está o pênfigo foliáceo endêmico (PFE), uma doença auto-imune da epiderme, endêmica no Brasil, caracterizada pela presença de auto-anticorpos direcionados contra a desmogleína 1, uma glicoproteína de adesão celular, constituinte dos desmossomos.

A etiologia do PFE é desconhecida e, em grande parte por consequência disto, o tratamento é difícil e com muitos efeitos colaterais. Sem tratamento adequado o pênfigo pode ser fatal porque grandes áreas da epiderme podem ser perdidas, sendo que a primeira linha de defesa do organismo é comprometida. Isto pode levar à perda de fluidos e infecções secundárias. Desta maneira é importante elucidar o componente genético envolvido na susceptibilidade à doença, uma vez que este pode auxiliar tanto na compreensão da patogênese, quanto na identificação de possíveis alvos terapêuticos que proporcionem melhores estratégias de tratamento.

Para tanto, este trabalho destina-se a investigar se polimorfismos genéticos de moléculas críticas na modulação da resposta imune - CD40, BLYS e CD19 - podem conferir maior susceptibilidade e/ou resistência ao PFE.

Interações célula-célula que requerem moléculas co-estimuladoras são essenciais para que a resposta imune seja efetiva, impedindo que as células envolvidas sejam deletadas ou tornem-se anérgicas. Interações entre CD40 e CD40L sobre células B (ou outras células apresentadoras de antígenos) e células T, respectivamente, são essenciais para que células B proliferem, mudem o isotipo de imunoglobulina secretada e para que se previna a apoptose de células B nos centros germinativos. Além disso, a interação CD40-CD40L também é essencial para a ativação das células T CD4, uma vez que induz o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras sobre a superfície destas células, necessárias para que estas sejam eficientemente

ativadas. Portanto, há uma cooperação entre células B e T, via co-receptores CD40-CD40L, permitindo que a resposta imune efetora seja montada. Logicamente, a resposta imune deve ser terminada para que a homeostase seja mantida. Isto depende da diminuição da expressão de CD40L após sua interação com CD40, sendo que a expressão desregulada dessa molécula pode contribuir para a auto-imunidade.

BLyS, uma citocina descoberta recentemente, liga-se a vários receptores sobre as células B e atua sinergisticamente com CD40L na ativação e expansão dessas células por intermédio da atenuação da apoptose. A apoptose de células B antígeno-específicas após ativação também é crucial para o controle negativo da resposta imune humoral. Ainda, BLyS pode aumentar a sobrevivência de células B indiscriminadamente, o que pode explicar o desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos transgênicos que superexpressam BLyS.

CD19 é uma molécula de superfície celular que regula o limiar de sinalização intracelular crítico para o desenvolvimento de células B e imunidade humoral. A manutenção da sinalização intracelular em limiares adequados têm papel fundamental na regulação da tolerância periférica. Desta forma, alterações nesses limiares devido à expressão elevada de CD19 podem resultar na quebra da tolerância periférica e levar à auto-imunidade.

Portanto, é evidente o potencial que as moléculas codificadas por variantes alélicas destes três genes têm de estarem contribuindo para o desencadeamento de doenças auto-imunes, sendo que a interação entre estas variantes pode exacerbar esta potencialidade.

Este trabalho faz parte de um projeto maior desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Humana, no qual investigam-se outros genes candidatos para associação com o pênfigo foliáceo endêmico, uma vez que a interação de vários locos e alelos pode alterar (acentuar ou diminuir) a susceptibilidade à doença. A identificação desses fatores é o princípio para a compreensão da complexidade do mecanismo auto-imune, e constitui-se num dos grandes desafios dos pesquisadores na atualidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS COMPLEXAS

Doenças podem ser classificadas de acordo com a contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais para a sua etiologia. Em geral, estes fatores interagem para desencadear a doença, mas com contribuições diferenciadas. Os distúrbios monogênicos estão entre aqueles nos quais o papel dos fatores genéticos é predominante e incontestável, uma vez que os padrões genealógicos mendelianos são consistentes (STRACHAN e READ, 2002). Já as doenças infecciosas são decorrentes principalmente de causas ambientais. Entre estes extremos existe um amplo espectro de condições, incluindo doenças oligogênicas ou poligênicas com variação na contribuição dos fatores ambientais (PETZL-ERLER, 1999). Como exemplos destas situações podem ser citadas as doenças do coração, diabetes do tipo 1, cânceres, esquizofrenia, lúpus eritematoso sistêmico e muitas outras. Todas são exemplos das chamadas doenças “complexas” ou “multifatoriais”, significando que elas não podem ser atribuídas a mutações em um único gene ou a um único fator ambiental.

As causas das doenças de etiologia complexa ainda são pouco conhecidas, o que torna o tratamento difícil e inespecífico. Assim sendo, é de grande importância a identificação dos fatores genéticos que contribuem para esse processo. Estes fatores, uma vez identificados, podem auxiliar não só o desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento, mas também oferecem uma contribuição potencial para o entendimento da etiopatogênese da doença, bem como podem prover novos métodos de diagnóstico e prevenção (PETZL-ERLER, 1999).

A contribuição genética que aumenta ou diminui o risco de desenvolvimento das doenças multifatoriais resulta de um grande número de variantes polimórficas com baixa penetrância, ou seja, as variantes exercem pequeno efeito fenotípico (WILLET, 2002). Para identificar alelos que conferem um baixo risco relativo têm sido utilizadas principalmente as análises de associação caso-controle. De modo diferente das análises de ligação que necessitam de centenas de famílias, as análises de associação requerem amostras de tamanho comparativamente menor (RISCH e MERIKANGAS, 1996).

Neste tipo de análise, são comparadas, entre pacientes e indivíduos saudáveis, as frequências alélicas e genotípicas das variantes de genes considerados candidatos a predispor à doença.

Muitas das doenças complexas são atribuídas a disfunções auto-imunes, tais como pênfigo foliáceo e vulgar, artrite reumatóide e os já citados diabetes tipo 1 e lúpus. Doenças auto-imunes são condições crônicas que se caracterizam pelo ataque do sistema imune a um ou mais órgãos próprios e afetam aproximadamente 5% da população (BECKER *et al.*, 1998). Os mecanismos envolvidos na auto-imunidade ainda são pouco conhecidos, mas a participação de um componente genético é demonstrada pelas: (i) a agregação familiar das doenças. Isso significa que há um risco maior de um consanguíneo apresentar a patologia, quando comparado com o risco de um indivíduo qualquer da população (STRACHAN e READ, 2002); e (ii) diferenças na manifestação das doenças entre indivíduos da mesma população, e ausência de manifestação clínica em parte dos indivíduos expostos aos fatores ambientais desencadeadores do processo.

Em decorrência das informações geradas pelo seqüenciamento do genoma humano, a descoberta de genes envolvidos em respostas imunes e a investigação das implicações de sua variabilidade, no que diz respeito a patogênese de doenças está em ritmo acelerado. Além de genes e alelos envolvidos na patogênese de doenças, os estudos de associação também permitem que sejam estimadas as frequências populacionais daqueles alelos, uma vez que os indivíduos-controles correspondem a indivíduos da população geral. Uma vez que polimorfismos genéticos diferem entre populações, a heterogeneidade de populações brasileiras acrescentará informações importantes para a compreensão das causas de doenças complexas. Além disso, estudos de doenças contribuem para o conhecimento da evolução e das implicações funcionais do polimorfismo genético.

2.2 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO (PFE)

2.2.1 Formas clínicas

Pênfigo compreende um grupo de doenças auto-imunes raras e graves, órgão-específicas da epiderme, caracterizadas pela produção de auto-anticorpos direcionados contra moléculas de adesão celular – as desmogleínas (AMAGAI, 1995a) – expressas sobre os queratinócitos. Tal reconhecimento imune resulta na formação de vesículas intra-epidérmicas. A unicidade das desmogleínas como auto-antígenos tem sido questionada. NGUYEN *et al.* (1998) argumentam que auto-anticorpos anti-desmogleínas sozinhos não são suficientes para desencadear as lesões características dessas doenças, mas que outros auto-anticorpos contra outros antígenos da superfície dos queratinócitos são necessários.

Existem três formas imunológicas de pênfigo: o pênfigo foliáceo (PF), o pênfigo vulgar (PV) e o pênfigo paraneoplásico (PPN). Cada uma dessas formas distingue-se das demais no que se refere à desmogleína alvo dos auto-anticorpos. Outro fator a ser considerado é se outras proteínas adicionais estão ou não envolvidas. Na pele, as principais desmogleínas (Dsgs) expressas são a Dsg1 e a Dsg3. A Dsg3 está presente na camada suprabasal (inferior) da epiderme e também nas mucosas. No pênfigo vulgar, os auto-anticorpos são direcionados contra a Dsg3. Devido à sua distribuição, as lesões no PV afetam as membranas mucosas com lesões cutâneas aparecendo secundariamente durante o curso da doença. Já a Dsg1 é restrita à camada subcórnea (superior) do epitélio, sendo a desmogleína alvo dos auto-anticorpos patogênicos no pênfigo foliáceo (PF). Devido à sua distribuição, as lesões no PF ocorrem estritamente na camada superficial da epiderme (CHIDGEY, 1997). No pênfigo paraneoplásico, além das desmogleínas, as proteínas plaquinas também são alvo dos auto-anticorpos e à semelhança do PV são encontradas lesões na pele e mucosas.

Há três formas clínicas de pênfigo foliáceo: forma localizada (frustra), forma generalizada e forma hiperpigmentada (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

Na forma localizada, as lesões em sua maioria, estão limitadas às áreas seborréicas da pele – face, cabeça, pescoço e partes altas do tronco. As lesões são vesículas e pequenas bolhas que rapidamente se rompem, deixando pequenas áreas erosivas. Após cicatrização completa, na dependência da cor da pele do paciente, podem deixar lesões pigmentadas. Estas lesões podem permanecer estáveis por meses ou regredir espontaneamente. Em alguns pacientes, entretanto, estas lesões se espalham pelo tronco e extremidades, progredindo para a forma generalizada do pênfigo foliáceo.

Três síndromes clínicas distintas são classificadas como forma generalizada de pênfigo foliáceo. Uma forma bolhosa-esfoliativa, quando os pacientes possuem a doença aguda, intensa, com lesões bolhosas por todo o corpo. Bacteremia ou septicemia não são observados, porém a exposição ao vírus Herpes simplex pode causar o desenvolvimento da erupção variceliforme de Kaposi, uma erupção com risco de letalidade. A segunda forma clínica inclui pacientes que desenvolvem um típico eritoderma esfoliativo. Erosões superficiais confluentes, crostosas e com exsudato sérico também são características. Infecções sobrepostas como dermatofitose, escabiose, verrugas e outras também podem complicar a forma generalizada. A terceira forma clínica inclui pacientes que exibem placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares, similares à da forma crônica localizada da doença.

A forma hiperpigmentada está associada à remissão da doença. Esta hiperpigmentação pode se restringir a áreas de lesões prévias, ou pode ser difusa, envolvendo regiões não afetadas. Antes do estabelecimento da terapia com esteróides, a hiperpigmentação era conhecida como “aurora da cura”, quando indivíduos de origem predominantemente européia adquiriam uma cor que os fazia parecerem mulatos, mulatos se pareciam com negros, e negros adquiriam uma coloração cinza-azulado-escuro.

2.2.2 Epidemiologia

O pênfigo foliáceo pode ser reconhecido sob duas formas: o **não-endêmico**, descrito pela primeira vez em Paris, em 1844, que é raro e ocorre esporadicamente em

todo o mundo, e o **endêmico**, também conhecido como *fogo selvagem*, foi registrado pela primeira vez no Brasil, em 1903, objeto de estudo deste trabalho (FIGURA 2.2). Formas endêmicas de pênfigo foliáceo também foram descritas na Colômbia (ROBLEDO, 1988 *apud* HANS-FILHO, 1999) e na Tunísia (MORINI, 1993 *apud* HANS-FILHO, 1999). Não há diferenças clínicas e histopatológicas entre os tipos endêmicos e, da mesma forma, entre as formas esporádica e endêmica.

A característica diferencial entre as formas de pênfigo foliáceo (PF) diz respeito à epidemiologia. Na França, a incidência é de 1,7 casos por milhão por ano. Destes, 73% correspondem ao pênfigo vulgar, a incidência aumenta com a idade, e a proporção sexual de afetados corresponde a 2 mulheres:1 homem. Na Tunísia a incidência é de 6-7 casos por milhão por ano. A maioria dos casos, 61%, corresponde ao pênfigo foliáceo, proporção de mulheres para homens afetados é de 4:1 e a taxa de incidência é maior entre mulheres jovens (BASTUJI-GARIN *et al.*, 1995). Já no Brasil é que o PF atinge sua maior incidência: 25-35 casos por milhão por ano. A doença ocorre de forma endêmica nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e principalmente Mato Grosso do Sul. Acomete principalmente pessoas que vivem ou viveram em áreas rurais, principalmente nas proximidades de rios e córregos. Frequentemente a doença aparece em crianças e jovens; e o pico de incidência é entre a segunda e terceira décadas de vida. A proporção sexual de afetados é de 1:1 (DIAZ *et al.*, 1989). Entre os índios Xavante, em Goiás e Terena, em Mato Grosso do Sul, a prevalência da doença é bastante elevada: 1,4% e 2,6%, respectivamente (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

No final da década de 1980, o pênfigo foliáceo brasileiro passou a ser chamado de pênfigo foliáceo endêmico (PFE), refletindo com mais precisão sua principal característica diferencial – a endemidade. Esta característica torna essa patologia especialmente interessante, sendo a única doença que é ao mesmo tempo auto-imune e endêmica (CAMPBELL *et al.*, 2001).



FIGURA 2.2 - LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO (FOTOS CEDIDAS PELO DOUTOR ALFREDO MARQUART).

2.2.3 Imunopatologia

A etiologia do PFE permanece desconhecida. A detecção de auto-anticorpos circulantes no soro de pacientes foi demonstrada através de imunofluorescência indireta (IFI) (BEUTNER *et al.*, 1964 *apud* CAMPBELL *et al.*, 2001). Os mesmos autores, por meio de imunofluorescência direta (IFD) da pele lesionada de pacientes mostraram a marcação da superfície celular epitelial, indicando a deposição de imunoglobulinas sobre a membrana dos queratinócitos.

Os anticorpos depositados sobre os queratinócitos são principalmente IgG, particularmente da subclasse IgG4, com títulos menores de IgG1, e com IgG2, IgG3 e IgM sendo muito pouco freqüentes (TREMEAU-MARTINAGE *et al.*, 1995 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a). Os anticorpos circulantes também são IgG4 e IgG1, e raramente IgG3 (JONES *et al.*, 1988 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a). A recuperação dos pacientes geralmente está correlacionada com o declínio dos títulos de IgG4, enquanto

os títulos de IgG1 muitas vezes permanecem detectáveis, ilustrando o papel patogênico dos anticorpos IgG4 (BHOL *et al.*, 1994 *apud* MARTEL *et al.*, 2001a).

Esses auto-anticorpos são direcionados contra a desmogleína 1 (Dsg1), uma glicoproteína transmembrânica, integrante dos desmossomos, e que tem uma participação fundamental na adesão celular entre os queratinócitos (WHEELER *et al.*, 1991). Quando reconhecida pelos auto-anticorpos, a Dsg1 perde a capacidade de exercer sua função de adesão celular e, em consequência disso formam-se as vesículas características da doença com desprendimento da camada superficial da epiderme, fenômeno conhecido como acantólise.

Existem evidências diretas de que auto-anticorpos anti-Dsg1 presentes no soro de pacientes são patogênicos. AMAGAI *et al.* (1995b) por meio de experimentos que envolvem imunoadsorção, demonstraram que uma proteína quimérica, contendo o domínio extracelular inteiro da Dsg1 e a região constante da IgG1, adsorve completamente a imunorreatividade dos anticorpos do soro de pacientes contra a superfície celular dos queratinócitos.

Diante do exposto acima, percebe-se que está bem definido o papel da imunidade humoral, por meio de anticorpos IgG4 contra a Dsg1. Em geral, a produção de anticorpos por células B requer a colaboração de células T CD4⁺. Como o *fogo selvagem* é uma doença auto-imune mediada por anticorpos é esperado que células T também participem da patogênese desta doença. A evidência desta participação é recente. Num estudo realizado com os indígenas Terena, LIN *et al.* (2000) demonstraram que células T de 13 dos 15 pacientes reconheceram a Dsg1 recombinante, sendo que a proliferação foi antígeno-específica. As características dos clones de células T que responderam especificamente à Dsg1 recombinante, sugerem que estas sejam células T de memória, enfatizando a possibilidade de células T participarem da resposta auto-imune.

2.2.4 Histopatologia

A característica histológica marcante do PF é a acantólise nas bolhas intra-epidérmicas. No entanto, o mecanismo molecular da acantólise permanece controverso.

Foi sugerido que a ativação do sistema complemento possa ter um papel relevante na acantólise, uma vez que as lesões epidérmicas de pacientes mostram grandes deposições do fator C3 e porque a adição de complemento às culturas celulares, previamente tratadas com anticorpos IgG de pacientes, intensifica o processo de acantólise (JORDON, 1980; *apud* HANS-FILHO *et al.*, 1999). Entretanto, a acantólise pode ser induzida *in vitro* por anticorpos sozinhos, sem complemento (MARTEL, 2001b). Portanto, parece que o sistema complemento não é necessário para o processo acantolítico, mas provavelmente pode intensificá-lo (DE MESSIAS *et al.*, 1989). Como o complemento é ativado permanece incerto. Anticorpos IgG4 não fixam complemento, mas como a doença está freqüentemente associada com IgG1, pode ser que ocorra uma ativação local do complemento pela via clássica. Alternativamente, C3 pode ser produzido por queratinócitos ativados, o que precisa ser melhor esclarecido (MARTEL *et al.*, 2001a).

Também foi sugerido que a patogenicidade dos anticorpos no pênfigo se dá pela ativação de proteases não específicas, através do sistema plasminogênio-plasmina. Foi demonstrada a existência de ativador de plasminogênio e atividade proteolítica induzida por auto-anticorpos em queratinócitos em cultura. O principal ativador de plasminogênio identificado é do tipo uroquinase (uPA). A uPA ativaria o plasminogênio, que por sua vez induziria a produção de plasmina, uma proteína com atividade proteolítica não-específica, que acabaria lisando as desmogleínas (XUE *et al.*, 1998). Entretanto, há controvérsias no que se refere à participação de uPA na acantólise e argumentos a favor do bloqueio específico da função das desmogleínas pelos anticorpos IgG: a elevação de uPA foi registrada em muitas doenças de pele sem acantólise e, a transferência passiva de IgG de pacientes para camundongos neonatos *knockout* para uPA induz acantólise no mesmo nível que em camundongos controle

(MAHONEY *et al.*, 1999). Portanto, o sistema plasminogênio-plasmina parece também não ter um papel importante na acantólise, mas pode atuar secundariamente na amplificação das lesões.

2.2.5 Tratamento

O tratamento do PF faz-se, principalmente, com corticóides por via oral. Por demandar um tratamento prolongado, há probabilidade de efeitos colaterais, como o desenvolvimento de infestações intestinais e infecções bacterianas extracutâneas, como pneumonias, infecções urinárias, tuberculose, septicemias e outras. Além disso, hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite e úlcera gastrintestinal e surtos psicóticos podem surgir durante o tratamento. Os pacientes devem ainda proteger-se da luz solar, uma vez que a luz ultravioleta pode induzir a formação de bolhas, sendo o sol um fator ambiental dos mais importantes no desenvolvimento e agravamento do PFE (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.2.6 Pênfigo como doença complexa - Genética e Ambiente

De acordo com o modelo multifatorial no qual insere-se o PFE, as doenças complexas não são atribuíveis a um único gene ou a um único fator ambiental.

Com relação aos fatores ambientais, WARREN *et al.* (2000) sugerem que um fator ambiental desencadeador da doença está agregado na área endêmica, pois verificaram que os títulos de anticorpos anti-Dsg1 em indivíduos saudáveis elevam-se com o aumento da proximidade da residência dessas pessoas com a área endêmica de Limão Verde, na qual vivem os indígenas Terena.

Há evidências de que um mosquito, mais especificamente um simuliídeo (Família Simuliidae), possa atuar como agente transmissor ou desencadeador da resposta auto-imune (LOMBARDI *et al.*, 1992). Recentemente, LI *et al.* (2003) mostraram que um número significativo de pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos como oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas, possuem

auto-anticorpos contra epítomos do quinto domínio extracelular (EC5) da Dsg1 e levantaram a hipótese de que antígeno(s) salivar(es) desses insetos podem conter uma molécula que reage de forma cruzada com a Dsg1 e desencadeia a resposta de anticorpos anti-EC5. De acordo com o modelo proposto, estes pacientes, assim como os pacientes com PFE em estágio pré-clínico, desenvolvem uma resposta inicial de anticorpos não-patogênica contra o EC5 da Dsg1. Esta região, que é muito pequena e próxima à membrana, pode ser críptica, ou seja, o EC5 pode ser sequestrado *in vivo* e conseqüentemente, é incapaz de ser reconhecido por anticorpos circulantes anti-EC5. Isto explica porque pacientes com oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas não têm pênfigo, uma vez que possuem anti-EC5. Já os pacientes que desenvolvem PFE seriam indivíduos geneticamente predispostos que, através do fenômeno de "espalhamento intramolecular de epítomos", produziriam anticorpos patogênicos contra os primeiro (EC1) e segundo (EC2) domínios extracelulares da Dsg1 (FIGURA 2.3). O espalhamento de epítomos é definido como uma resposta autorreativa específica de célula B ou T a epítomos endógenos, que são distintos dos epítomos desencadeadores da doença, e também não é devido a reações cruzadas de anticorpos. Estes epítomos podem ser derivados da proteína reconhecida inicialmente ou derivar de proteínas secundárias, sendo liberados durante uma resposta inflamatória ou autoimunidade crônica.

Os domínios EC1 e EC2 são os responsáveis pela função de adesão das desmogleínas e quando reconhecidos pelos auto-anticorpos podem perder a capacidade de mediar adesão celular e a doença é desencadeada. Este modelo também pode explicar porque muitos indivíduos saudáveis e parentes consangüíneos de pacientes possuem anticorpos anti-Dsg1 e não desenvolvem a doença.

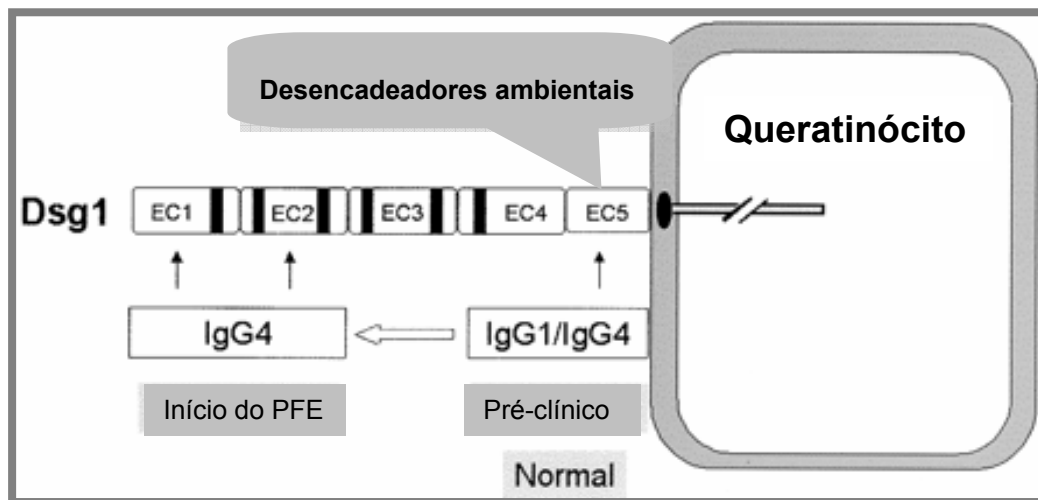


FIGURA 2.3 – MODELO DA VIA IMUNOPATOGÊNICA DO PFE. FATORES AMBIENTAIS DESENCADEIAM A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGG1 E IGG4 NÃO-PATOGÊNICOS CONTRA O DOMÍNIO EC5 DA DSG1. EM INDIVÍDUOS GENETICAMENTE PREDISPOSTOS, O ESPALHAMENTO INTRAMOLECULAR DE EPÍTOPOS RESULTA NA GERAÇÃO DE ANTICORPOS IGG4 CONTRA OS DOMÍNIOS EC1 E EC2, O QUE INDUZ A DOENÇA (LI *ET AL.*, 2003).

Já a participação de um componente genético na patogênese do PFE é evidenciada pela agregação familiar da doença. Poder-se-ia inferir que a agregação é consequência do compartilhamento do mesmo ambiente entre indivíduos da mesma família. No entanto, o número de casos entre indivíduos geneticamente relacionados é muito superior ao de indivíduos com ligações apenas sociais (esposo-esposa, cunhados etc.). Esta desproporcionalidade dos índices, indica a existência de uma predisposição genética a esta doença (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

Em virtude de sua função na resposta imune e do elevado grau de polimorfismo, os genes situados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), chamados de genes HLA em humanos, estão entre os mais investigados para associação com doenças auto-imunes, incluindo-se o PF. A associação de moléculas HLA com doenças auto-imunes é devida ao fato de que os aminoácidos polimórficos

no sítio de ligação aos peptídeos definem a afinidade da ligação do peptídeo que está sendo apresentado e, portanto, a capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (TODD, 1999).

Num estudo pioneiro, PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) investigaram, por meio de tipagem sorológica, uma população caucasóide do sul do Brasil, com objetivo de verificar se genes HLA estavam associados à susceptibilidade ao PFE. Foi constatada associação primária positiva com HLA DR1 e DR4, e associação primária negativa com DQ2. Estes resultados foram recentemente confirmados e ampliados através de tipagem molecular (PAVONI *et al.*, 2003), num estudo que objetivou avaliar as associações entre PFE e alelos *HLA-DRB1*. Outros grupos, trabalhando tanto com o pênfigo foliáceo endêmico (MORAES *et al.*, 1991; MORAES *et al.*, 1997), quanto com a forma esporádica (MIYAGAWA *et al.*, 1999; LOISEAU *et al.*, 2000), encontraram resultados semelhantes. As discordâncias nos resultados das associações são resultantes de diferenças do polimorfismo HLA entre as populações analisadas, já que associações não detectadas em um certo grupo étnico podem ser explicadas pela ausência ou baixa frequência dos alelos correspondentes nesta população (PAVONI *et al.* 2003). É isto, por exemplo, que ocorre nas populações ameríndias analisadas (MORAES *et al.*, 1997; CERNA *et al.*, 1993), nas quais um padrão diferente de associações foi registrado.

Apesar das discrepâncias nos resultados das associações, foi verificado que alelos *DRB1*, positivamente associados com PFE em diferentes grupos étnicos, compartilham uma sequência de aminoácidos nas posições 67-74, localizada na terceira região hipervariável da molécula: LLEQRRAA (MORAES *et al.*, 1997). Estes dados levaram estes pesquisadores a propor que esta sequência é que está envolvida na susceptibilidade ao PFE, e não alelos em particular. No trabalho de PAVONI *et al.* (2003) esse motivo também foi positivamente associado com o PFE. Entretanto, alelos que não têm esse motivo também estão associados com a doença, sugerindo que outras particularidades das moléculas HLA possam ser importantes no reconhecimento do antígeno.

Foram encontradas associações das variantes genéticas -590(C,T) de interleucina 4 e -174(C,T) da interleucina 6 com o PFE. As interleucinas são moléculas críticas no controle e modulação das respostas imunes. Constataram-se associação positiva com o genótipo T/T (OR = 2,71) e associação negativa com a variante C (OR = 0,13) de *IL4*, e associação negativa do genótipo C/C (OR = 0,13) e associação positiva de portadores do alelo G (OR = 7,66) em *IL6* (PEREIRA *et al.* 2004).

Com relação ao polimorfismo do auto-antígeno, não foram encontradas associações de variantes genéticas de *DSG1* 809(C,T) e 1660(G,A) com o PFE (MALHEIROS, 2003).

Muito informativos são os estudos que demonstram as interações entre os alelos de susceptibilidade e resistência dentro de um mesmo loco (PAVONI *et al.*, 2003), e os que analisam interações entre locos (MARTEL *et al.*, 2002). No primeiro, que analisou a interação entre os alelos do gene *HLA-DRB1*, foi demonstrado o efeito de diferentes combinações genóticas sobre a doença. As interações entre os alelos de susceptibilidade, protetores e neutros desviaram claramente do modelo co-dominante. O segundo combinou análises dos polimorfismos do loco *HLA-DRB1* e do loco *DSG1*, que codifica o auto-antígeno da doença. As análises combinadas demonstraram que o alelo *DRB1**04 e o genótipo C/C na posição 809 de *DSG1* interagem para conferir uma alta susceptibilidade ao PF.

Estudos que analisam interações intra- e inter-gênicas demonstram a complexidade genética das doenças auto-imunes, ao mesmo tempo que são relevantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese destas doenças.

2.3 TOLERÂNCIA E QUEBRA DA TOLERÂNCIA AO PRÓPRIO

Muitos dos indivíduos expostos aos agentes desencadeadores ambientais exógenos não desenvolvem doenças auto-imunes. Uma explicação para esta resistência é que muitas dessas pessoas possuem um complemento de alelos em genes imunorreguladores que garantem que as respostas de células T e B a antígenos próprios seja evitada (TODD, 1999). O principal mecanismo responsável pela ausência de reação imunológica contra antígenos próprios é a deleção clonal de células T autorreativas no timo. Até a década de 1960, acreditava-se que todos os linfócitos reativos ao próprio fossem eliminados durante seu desenvolvimento e que uma falha na eliminação desses linfócitos levaria à auto-imunidade. No final dos anos 1970, muitos pesquisadores mostraram que nem todos os linfócitos reativos ao próprio são deletados durante a maturação (KUBY, 2002), ou porque a afinidade com o antígeno é baixa (e este não está presente no timo em quantidades suficientes), ou porque o antígeno não estava presente durante a ontogenia das células T (proteínas restritas a determinados órgãos, ditas "seqüestradas") (JANEWAY e TRAVERS, 1997). As células que escapam da deleção passam a integrar o conjunto de células T periféricas. Portanto, indivíduos saudáveis podem possuir linfócitos autorreativos, ou seja, a auto-imunidade pode ser uma condição fisiológica.

A presença dessas células autorreativas via de regra não resulta em auto-imunidade patológica, pois sua atividade pode ser regulada por mecanismos periféricos. Entre estes estão a anergia e a supressão clonal (KUBY, 2002). Vários mecanismos podem resultar na supressão da resposta dessas células, entre eles estão a ação de células supressoras e a baixa afinidade das células T autorreativas em relação ao auto-antígeno. Já a anergia é consequência da ausência ou redução de um sinal co-estimulador necessário à ativação das células T e B em adição ao fornecido pela ligação entre o receptor de linfócito T (TCR) e o complexo peptídeo/MHC, e o do receptor de linfócitos B (BCR) e o antígeno, respectivamente (JANEWAY e TRAVERS, 1997). Uma quebra nesta regulação pode levar à ativação de clones de células B ou T autorreativos. Dentre as várias moléculas co-estimuladoras que estão envolvidas neste processo estão CD40, BLyS e CD19.

A ativação dos clones autorreativos pode ocorrer por várias causas e quase sempre está associada a uma infecção por microrganismos. A liberação de antígenos em decorrência de uma infecção ou trauma, antes restritos a um determinado local do organismo e que, a princípio, não tinham contato com células do sistema imune (antígenos seqüestrados), pode levar à ativação de linfócitos B ou T que escaparam da deleção clonal por não terem interagido anteriormente com esses auto-antígenos (KUBY, 2002).

Microrganismos infecciosos podem ativar clones de linfócitos T autorreativos por possuírem antígenos muito semelhantes a auto-antígenos, levando a uma reação cruzada. Este fenômeno é conhecido como mimetismo molecular e já foi verificado na esclerose múltipla (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995). Os receptores de células T podem reconhecer um número surpreendente de peptídeos estruturalmente relacionados derivados de diferentes antígenos e ligados a moléculas MHC próprias. Esta ampla diversidade do reconhecimento por células T favorece a ocorrência de mimetismo molecular. A existência de um repertório tão diverso faz sentido dentro do contexto de resistência a doenças infecciosas: se o repertório for muito reduzido no timo ou demasiadamente controlado na periferia, pode não haver diversidade adequada para o reconhecimento de antígenos estranhos (TODD, 1999).

Com relação ao pênfigo foliáceo, demonstrou-se a presença de auto-anticorpos em uma grande percentagem (55%) de indivíduos saudáveis (WARREN *et al.*, 2000). A geração desses auto-anticorpos pode, em teoria, ser precedida pela apresentação de antígenos próprios, levando à ativação de células T, seguida pela ativação de células B e subsequente produção de anticorpos. Nesses indivíduos, parece que os mecanismos responsáveis pela auto-tolerância estão sendo eficazes, ao contrário dos pacientes nos quais falhas nesse processo desencadeiam a auto-imunidade. Como mencionado anteriormente, LOMBARDI *et al.* (1992) e LI *et al.* (2003) sugerem que um mosquito possa atuar como agente transmissor ou desencadeador da resposta auto-imune no PFE. A exposição crônica aos antígenos inoculados por esses mosquitos poderia ativar a produção de auto-anticorpos em indivíduos predispostos, e estes auto-anticorpos poderiam reagir de maneira cruzada com antígenos epidérmicos e causar a acantólise.

2.4 GENES CANDIDATOS

Genes são candidatos a conferir susceptibilidade a uma doença de acordo com sua função, ou localização cromossômica (pode estar proximamente ligado a um marcador associado), desde que sejam polimórficos. Neste contexto, devido aos importantes papéis desempenhados na regulação da resposta imune e por serem geneticamente polimórficos, os produtos de variantes alélicas dos genes *CD40*, *BLYS* e *CD19* são bons candidatos a modularem susceptibilidade e/ou resistência ao PFE.

2.4.1 *CD40*, o gene que codifica uma molécula essencial para o desenvolvimento de células B

Normalmente, respostas imunes a antígenos estranhos são orquestradas por uma comunicação recíproca entre células T e B antígeno-específicas, e entre células T e outras células apresentadoras de antígenos (APC), tais como células dendríticas e macrófagos (CLARK e LEDBETTER, 1994).

A interação entre antígenos estranhos e receptores das células B (BCR) induz as células B a proliferarem e se diferenciarem em plasmócitos, os quais produzem anticorpos, ou em células B de memória que respondem rapidamente a um encontro subsequente com o mesmo antígeno. Estes processos, entretanto, requerem o auxílio de células T ativadas. A ativação de células T $CD4^+$ é dependente de interações com células apresentadoras de antígenos, as quais podem ser as próprias células B. Para serem ativadas, células T precisam receber vários sinais. Um sinal é antígeno-específico e fornecido pela ligação do receptor de células T (TCR) ao complexo formado por uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e o peptídeo antigênico na superfície de células APC. Sinais adicionais das APC são fornecidos pela interação das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 (sobre as células B ou outras APC) e CD28 (sobre células T). Uma vez ativadas, as células T ativam as células B (que especificamente apresentam o mesmo complexo de antígenos estranhos e proteínas MHC de classe II em sua superfície) pela liberação de

citocinas (IL-2, IL-4 e IL-5) e por contato intercelular direto (FIGURA 2.4). As moléculas CD40 e CD40L são as responsáveis por este contato (CLARK e LEDBETTER, 1994).

CD40, uma glicoproteína transmembrânica do tipo I, de aproximadamente 48 kDa, é um membro da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) e é expressa constitutivamente sobre uma variedade de tipos de células, incluindo células B, macrófagos e células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, epiteliais e queratinócitos (van KOOTEN *et al.*, 2000). O ligante de CD40 (CD40L), também conhecido como CD154 e gp39, é um membro da superfamília de fatores de necrose tumoral (TNF) que é expresso sobre a superfície de células T CD4⁺ ativadas mas não em células T em repouso (NOELLE *et al.*, 1992) e parece que pode ser expresso sobre células B em certas condições patológicas (LIOSSIS *et al.*, 1996). É uma glicoproteína transmembrânica do tipo II, de aproximadamente 33 kDa consistindo de 261 aminoácidos (STAMENKOVIC, 1989).

A interação entre CD40 e CD40L promove a proliferação das células B, a mudança de isotipo de imunoglobulina, a geração de células de memória e previne apoptose de células B nos centros germinativos. Quando a interação CD40-CD40L é bloqueada *in vitro* por CD40 solúvel ou anticorpos monoclonais para CD40L, células B não proliferam nem produzem imunoglobulinas em resposta aos sinais de células T (NOELLE *et al.*, 1992).

A grande importância dessa interação na ativação de células B é demonstrada por pacientes com a síndrome da hiper-IgM (SEYAMA *et al.*, 1998), provocada por mutações no gene *CD40L*. Apesar destes pacientes terem células B que produzem IgM, suas células B são incapazes de mudar a classe de imunoglobulina e também não formam centros germinais em resposta a antígenos estranhos. Estes pacientes, conseqüentemente, são imunodeficientes e sofrem de infecções oportunistas e recorrentes, doenças auto-imunes e linfoproliferativas.

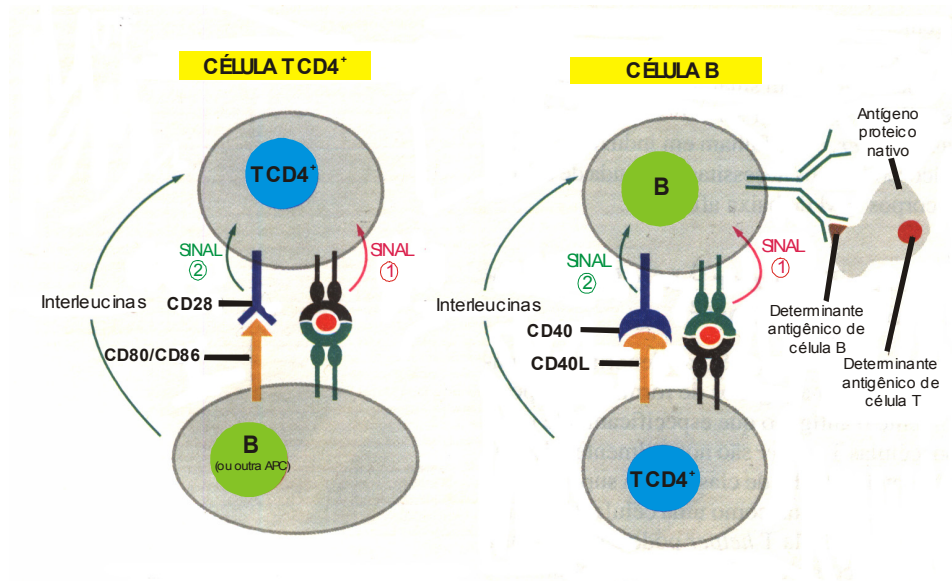


FIGURA 2.4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SINAIS NECESSÁRIOS PARA ATIVAR UMA CÉLULA B E UMA CÉLULA T $CD4^+$. O SINAL 1 É FORNECIDO PELA INTERAÇÃO ENTRE O TCR E O COMPLEXO PEPTÍDEO/MHC II E O SINAL 2 É FORNECIDO POR MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS (MODIFICADO DE ALBERTS *et al.*, 1997).

A interação CD40-CD40L também tem papel importante na ativação das células T, promovendo um aumento na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 sobre as células B e outras APC. Anticorpos monoclonais contra CD40 e CD40L inibem a indução de CD80 e CD86 sobre as células B por células T ativadas (GREWAL e FLAVELL, 1996). Portanto, uma co-estimulação recíproca pode resultar se células B ou T são ativadas: células T ativadas expressando CD40L induzem células B em repouso a expressar CD80 e células B ativadas expressando CD80 induzem células T a expressar CD40L (CLARK e LEDBETTER, 1994).

Ainda, a co-estimulação CD40-CD40L pode estar envolvida na modulação do repertório de células T através do processo de seleção negativa no timo. FOY *et al.* (1995) demonstraram que o impedimento da interação CD40-CD40L por anticorpos anti-CD40L bloqueia o processo de seleção negativa. Da mesma maneira, o tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais anti-CD40 impede a deleção de células

T que reagem com super-antígenos endógenos (DURIE *et al.*, 1994). Embora seja bem conhecido que as seleções positiva e negativa requerem a interação de TCR com o complexo peptídeo/MHC, o papel das moléculas co-estimuladoras no processo de seleção ainda não é bem entendido. Desde que CD40 é expresso sobre células epiteliais tímicas, células dendríticas tímicas e talvez em outras APC no timo, e desde que a interação CD40-CD40L aumenta a expressão de moléculas co-estimuladoras sobre uma variedade de tipos de células, foi sugerido um possível envolvimento de CD40 e CD40L na seleção tímica.

ARMITAGE *et al.* (1993) fizeram ensaios de proliferação celular *in vitro* e examinaram a habilidade de CD40L recombinante induzir proliferação e secreção de imunoglobulinas por células B humanas na presença e ausência de citocinas. Foi verificado que CD40L provê um co-estímulo essencial juntamente com IL-4 para a produção de IgG4 e IgE. Este dado é interessante uma vez que a principal subclasse de imunoglobulina patogênica no PFE é a IgG4.

2.4.1.1. Interação CD40-CD40L em doenças auto-imunes

Experimentos com murinos que desenvolvem doenças auto-imunes induzidas ou espontâneas têm revelado os possíveis mecanismos pelos quais a interação inadequada entre CD40-CD40L pode levar à auto-imunidade, além de sugerir a potencialidade destas moléculas como alvos terapêuticos.

Esses experimentos foram realizados com animais que desenvolvem nefrite de lúpus, artrite induzida por colágeno e encefalomielite alérgica experimental, equivalentes das doenças humanas lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e esclerose múltipla, respectivamente. Os ensaios baseiam-se no bloqueio da interação CD40-CD40L por meio de anticorpos anti-CD40L. Em todos os casos o tratamento com anti-CD40L causa a remissão da doença ou impede o seu início.

Foi proposto que o mecanismo de ação da terapia na nefrite de lúpus se deve ao bloqueio da produção de células B auto-imunes que produziriam auto-anticorpos patogênicos. O sistema imune mantém a homeostase regulando e permitindo somente

a expressão transitória de CD40L sobre as células T ativadas (YELLIN *et al.*, 1994; CASTLE *et al.*, 1993). A expressão persistente de CD40L, presumivelmente, rompe este ponto regulador de checagem e permite que células inapropriadamente ativadas (células auto-imunes) escapem da apoptose (DESAI-MEHTA *et al.*, 1996). Na verdade, foi verificado que não apenas as células T, mas também as células B de murinos e de pacientes humanos com lúpus eritematoso sistêmico expressam níveis altos de CD40L sem estimulação. Desta maneira, as células B podem amplificar e sustentar uma resposta auto-imune porque expressam CD40L e podem interagir com outras células B auto-imunes que expressam CD40. Portanto, a super-expressão de CD40L sobre células B poderia aumentar a interação célula B-B via CD40, resultando na hiperatividade das células B, o que tem sido observado nessa doença. Além disso, esta interação pode impedir a apoptose ou anergia de células B auto-imunes e torná-las mais susceptíveis a citocinas liberadas por células T patogênicas (LIOSSIS *et al.*, 1996).

Na artrite induzida por colágeno, a administração de anticorpos anti-CD40L, juntamente com a imunização com colágeno tipo II, bloqueia o início da doença em camundongos. O mecanismo provavelmente responsável por este efeito terapêutico é o bloqueio da sinalização via CD40 para células APC, impedindo o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86). Assim, células T CD4⁺ não seriam geradas e conseqüentemente anticorpos anti-colágeno II também não seriam produzidos (DURIE *et al.*, 1993).

Da mesma maneira, o mecanismo provavelmente responsável pelo efeito terapêutico dos anticorpos anti-CD40L na encefalomielite alérgica experimental se dá pelo bloqueio da sinalização via CD40 para células APC. Além disso, o bloqueio do sinal via CD40 em células endoteliais do sistema nervoso central (SNC) impediria a expressão de moléculas de adesão e, portanto, a migração de células inflamatórias para o SNC (GERRITSE *et al.*, 1996).

Com relação a doenças auto-imunes de pele em humanos, DENFELD *et al.* (1996) demonstraram que a interação CD40-CD40L pode estar envolvida na patogênese da psoríase, uma doença inflamatória da pele mediada por células T.

Queratinócitos de pacientes com psoríase têm uma expressão aumentada de CD40 na superfície. Dessa forma, células T inflamatórias ativadas expressando CD40L podem interagir com queratinócitos que expressam CD40.

Ainda não foi investigado se a expressão de CD40 sobre queratinócitos tem alguma implicação funcional para a patogênese do pênfigo foliáceo. No entanto, a identificação de variantes genéticas dessas moléculas, que confirmam resistência e/ou susceptibilidade à doença, podem fornecer importantes indícios de que esta implicação funcional realmente existe. Isto seria de grande importância, pois, como demonstrado nos modelos murinos, a terapia que bloqueia a interação CD40-CD40L é eficiente. Muito embora a complexidade e heterogeneidade genética das doenças auto-imunes humanas sugiram cautela quanto a previsões imaturas, é evidente a potencialidade destas moléculas como alvos terapêuticos de doenças auto-imunes, sendo que mais pesquisas são necessárias para corroborar esta potencialidade. Além disso, a terapia anti-CD40L oferece as vantagens de não requerer o conhecimento prévio da estrutura do auto-antígeno e de ser relativamente específica, já que a molécula CD40L é expressa apenas sobre células T ativadas pelo antígeno, as quais constituem a maioria das células T auto-imunes patogênicas (DATTA *et al.*, 1997).

2.4.1.2 Polimorfismos em *CD40* e estudos de associação

O gene *CD40* está localizado em 20q11 e sua região transcrita compreende 9 exons e 8 introns. Apenas duas regiões polimórficas foram descritas em *CD40* até o momento (FIGURA 2.4.1). Através de uma triagem genômica, TOMER *et al.* (2002) encontraram um loco de susceptibilidade à Doença de Graves (DG) que mapearam em 20q. A análise posicional de genes candidatos demonstrou que o gene *CD40* é o gene de susceptibilidade à DG.

O seqüenciamento dos exons revelou dois SNPs (single nucleotide polymorphism) em *CD40*: um C,T na posição -1 (uma base antes do primeiro códon ATG) e outro C,T no intron 4, vinte bases a montante da extremidade 3' do exon 4.

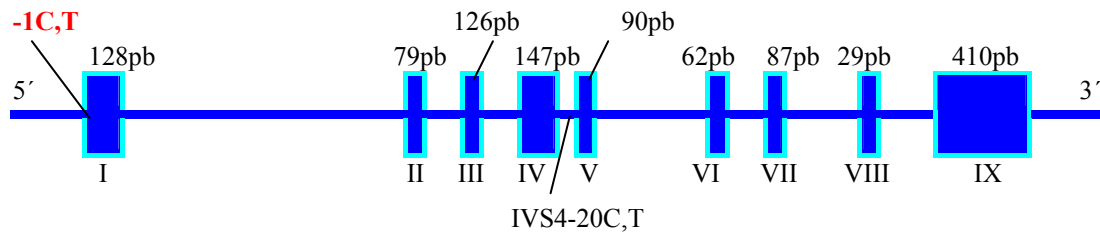


FIGURA 2.4.1 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE *CD40* E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS. EM VERMELHO É DESTACADO O SNP ESTUDADO NESTE TRABALHO.

Um estudo de associação caso-controle destes dois SNP com pacientes de DG e indivíduos-controle caucasianos mostrou uma associação positiva do genótipo -1C/C e DG ($P = 0,048$, $RR = 1,6$). Não foram encontradas associações com o SNP no íntron 4 (TOMER *et al.*, 2002).

Baseando-se em possíveis implicações funcionais na regulação dos níveis de tradução de CD40, no presente trabalho foi analisada apenas a posição -1C,T, uma vez que se encontra próxima ao sítio de início de tradução.

2.4.2 *BLYS*, o gene que codifica a molécula estimuladora de linfócitos B

Sinais de sobrevivência são críticos para o desenvolvimento e manutenção do repertório de células do sistema imune, bem como regulam a magnitude e duração das respostas imunes (KAYAGAKI *et al.*, 2002). Muitas citocinas, tais como CD40L funcionam como potentes fatores de sobrevivência para populações linfóides específicas. De forma semelhante, BLYS é uma citocina cuja expressão é induzida por interferon gama, crítica para a sobrevivência, maturação e tolerância das células B na periferia. Tem papel importante na indução da produção de imunoglobulinas pelas células B e é essencial para a formação de centros germinativos no baço, que são os

sítios de maturação da afinidade de anticorpos e formação das células B de memória (YAN *et al.*, 2000).

BLyS (também conhecido como BAFF, TALL-1, zTNF4, THANK a TNFS 13B), membro da família TNF caracterizado recentemente (MOORE *et al.*, 1999), é expresso sobre macrófagos, monócitos, células dendríticas e células T. Como outros membros da família TNF, existe na forma ligada à membrana (285 aminoácidos) e na forma solúvel (152 aminoácidos), sendo essa proteína clivada por proteases tipo furinas. A forma transmembrânica é do tipo II e tem aproximadamente 17 kDa.

Modelos animais têm ajudado a elucidar o papel desta molécula nas respostas imunes, bem como seu papel no desenvolvimento da auto-imunidade. Camundongos BLyS^{-/-} não têm células B maduras, resultando em baixos níveis de anticorpos circulantes e diminuição da resposta imune mediada por anticorpos (GROSS *et al.*, 2001). Em contraste, camundongos transgênicos que superexpressam BLyS desenvolvem sintomas característicos de lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome de Sjögren (SS), indicando um papel importante para os sinais mediados por BLyS no desenvolvimento e sobrevivência a longo termo de células B autorreativas. Além disso, murinos que desenvolvem nefrite de lúpus espontaneamente têm níveis elevados de BLyS circulante (GROSS *et al.*, 2000).

Não só os modelos animais, mas humanos sofrendo de doenças auto-imunes como LES, artrite reumatóide (AR) e síndrome de Sjögren têm níveis séricos de BLyS mais elevados quando comparados com indivíduos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2001; GROOM *et al.*, 2002; CHEEMA *et al.*, 2001). Células B autorreativas são mantidas sob controle por múltiplos mecanismos, incluindo deleção, mas níveis inapropriadamente altos de um fator de sobrevivência, tal como BLyS, pode sobrepor-se a tal mecanismo regulador e levar à auto-imunidade. Embora um elo causal ainda não tenha sido estabelecido, os níveis elevados de BLyS em distúrbios auto-imunes sugerem esta possibilidade (SESHASAYEE *et al.*, 2003).

BLyS pode ligar-se a três receptores, BCMA (B cell maturation antigen), BR3 (BLyS receptor 3, também chamado de BAFF-R) e TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), todos expressos sobre as

células B (GROSS *et al.*, 2000; THOMPSON *et al.*, 2000). BR3 e TACI também são expressos sobre células T em repouso e células T CD4⁺ ativadas, respectivamente (YAN *et al.*, 2000). Enquanto uma função essencial para BLyS no desenvolvimento da célula B foi estabelecida, papéis distintos para cada um desses receptores ainda não estão completamente elucidados, havendo resultados contraditórios. Camundongos BCMA^{-/-} foram originalmente descritos como não tendo fenótipo discernível, sendo BCMA considerado funcionalmente redundante (XU *et al.*, 2001). Subseqüentemente, mostrou-se que BCMA tem importante papel para sobrevivência a longo termo dos plasmócitos na medula óssea e prolonga a produção de anticorpos (O'CONNOR *et al.*, 2004). Já camundongos que expressam BR3 mutante não-funcional exibem um bloqueio no desenvolvimento das células B com drástica diminuição do número de células B na periferia (YAN *et al.*, 2000). Em adição, células B de camundongos com BR3 mutado são incapazes de responder a BLyS solúvel demonstrando um papel crítico para BR3 na atividade das células B (THOMPSON *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2000). Já camundongos TACI^{-/-} desenvolvem linfoproliferação e glomerulonefrite auto-imune fatal, proteinúria e níveis elevados de auto-anticorpos circulantes. Estes resultados indicam que BR3 é um receptor estimulador, ou seja, a ligação BLyS/BR3 fornece sinais de sobrevivência para células B, enquanto TACI é um receptor inibidor que atua na manutenção da homeostase de células B (SESHASAYEE *et al.*, 2003).

O mecanismo efector estimulador de BLyS/BR3 é fornecido por um efeito anti-apoptótico mediado pela ativação do fator de transcrição NF-κB, resultando num sinal de sobrevivência que é crítico para a manutenção das células B na periferia (SESHASAYEE *et al.*, 2003). A atenuação da apoptose por BLyS está correlacionada com mudanças na razão entre proteínas da família Bcl-2 em favor da sobrevivência celular, predominantemente pela redução das proteínas pró-apoptóticas Bak e aumento da expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, que são inibidoras da apoptose (DO *et al.*, 2000). Além disso, acredita-se que os sinais excessivos de sobrevivência desencadeados por BLyS em camundongos transgênicos, via superexpressão de Bcl-2, eliminam os sinais de morte para células B autorreativas que estão em processo de

maturação no baço, sendo este um ponto de verificação crítico do sistema imune (DO *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais TACI desencadeia sinais inibidores induzidos por BLyS não são completamente entendidos, mas acredita-se que BLyS/TACI induza a apoptose e promova a sobrevivência de células B. É possível que a função inibidora de TACI se deva à sua habilidade de seqüestrar BLyS impedindo sua ligação a BR3, inibindo assim a sobrevivência das células B (SESHASAYEE *et al.*, 2003). Neste contexto, é interessante observar o que acontece com as interações funcionais entre BR3 e TACI quando células B, expressando ambos os receptores, entram em contato com BLyS. Células B em repouso expressam níveis mais altos de transcritos de BR3 em comparação com transcritos de TACI ou BCMA, e isto pode servir para liberar um sinal de sobrevivência constante. Sob ativação com BLyS, a expressão dos transcritos de TACI é seletivamente aumentada para níveis mais altos que os de BR3. A partir destes resultados SESHASAYEE *et al.* (2003) sugerem que BLyS pode seletivamente ser capaz de sinalizar para a célula B devido ao aumento da expressão de TACI e que, portanto, TACI pode ter um papel inibidor e servir para terminar respostas imunes num estágio posterior à ativação da célula B, de forma semelhante aos papéis de CD28 e CTLA4 na regulação das respostas imunes de células T.

Um sistema no qual o mesmo ligante é capaz de induzir tanto sinais estimuladores quanto inibidores, pela ligação a receptores alternativos, é encontrado na ativação das células T. Por isso, sugere-se que BLyS/TACI-BR3-BCMA seja um sistema análogo ao que existe para células T, no qual interações entre ligantes-receptores CD80/CD86 - CD28/CTLA4 operam para regular as funções das células T (SESHASAYEE *et al.*, 2003). Neste sistema, CD28 funciona como um co-receptor estimulador, enquanto CTLA4 provê sinal inibidor. Da mesma forma, TACI quando ligado por BLyS resulta em inibição da atividade da célula B e BR3 quando ligado leva à estimulação e sobrevivência.

Apesar de vários pesquisadores sugerirem um papel inibidor para BLyS-TACI, outros sugerem que TACI é um receptor estimulador e que inclusive atua de maneira similar à interação CD40/CD40L. Segundo YAN *et al.* (2000) existem várias

similaridades entre os sistemas BLyS/TACI e CD40/CD40L: ambos os ligantes pertencem à família TNF e são expressos sobre células T ativadas e ambos os receptores são expressos sobre células B, são homólogos à família TNFR e sinalizam através do fator de transcrição NF- κ B. Deste modo, a interação entre BLyS e TACI poderiam fornecer auxílio a células B mediado por células T de maneira similar à interação entre CD40 e CD40L. Estas conclusões foram baseadas em experimento *in vitro*, no qual o bloqueio da ativação de TACI impediu a produção de NF- κ B induzida por BLyS e *in vivo*, no qual tratamento de camundongos imunizados com TACI-Fc (bloqueio da função de TACI) inibiu a produção de anticorpos IgM e IgG1 antígeno-específicos e aboliu a formação de centros germinais. YAN *et al.* (2000) também sugerem que pode haver um relacionamento funcional e temporal entre CD40-CD40L e BLyS-TACI. Em camundongos CD40^{-/-} ou CD40L^{-/-} a resposta humoral de IgG é comprometida, mas a de IgM é normal. Já camundongos nos quais TACI é bloqueado com anticorpos, mostram déficit de ambos IgM e IgG. Com base nestes resultados, os autores sugerem que BLyS e TACI operam nos estágios iniciais da ativação de células B, uma vez que o bloqueio de sua função compromete todas as fases da resposta humoral. Em contraste, CD40 e CD40L operariam nos estágios posteriores de ativação da célula B, sendo que seu bloqueio compromete apenas a fase tardia da resposta imune.

A interação entre BLyS e CD40L foi sugerida também por outros pesquisadores. DO *et al.* (2000) demonstraram, através de ensaios de proliferação celular *in vitro*, que BLyS coopera sinergisticamente com CD40L na ativação e expansão das células B devido à atenuação da apoptose. No entanto, neste experimento não foi evidenciado a qual dos receptores BLyS estava se ligando.

DO *et al.* (2000) sugerem ainda que a atenuação da apoptose por BLyS não é restrita a células B após ativação por antígenos ou CD40L, mas também aumenta a sobrevivência de células B em repouso. Isto implica que BLyS pode contribuir para a conservação de ambos os repertórios de células B e para o desenvolvimento de doenças auto-imunes policlonais. A constatação de que BLyS aumenta a sobrevivência de células B indiscriminadamente, pode explicar o desenvolvimento de doenças auto-

imunes em camundongos transgênicos que superexpressam BLyS. A deleção ou anergia de células B autorreativas previne a auto-imunidade, e a apoptose de células B antígeno-específicas após ativação é crucial para o controle negativo da resposta imune humoral. Como BLyS amplifica a ativação das células B, gerada por CD40L, pode haver um resgate das células que estão replicando ativamente, as quais, de outro modo seriam eliminadas por apoptose (DO *et al.*, 2000).

O sistema receptor de BLyS mostra uma complexidade biológica intrigante, na qual dois dos receptores, TACI e BCMA, também interagem com outro ligante da família TNF conhecido como APRIL. (A proliferating inducing ligand). A função de APRIL não é completamente entendida. April recombinante ou derivada de macrófagos não possui atividade estimuladora de células B *in vitro*. Animais transgênicos APRIL^{-/-} não têm defeitos imunes aparentes. Estes animais também não desenvolvem doenças auto-imunes semelhantes aos animais transgênicos para BLyS.

De acordo com o exposto, percebe-se que ainda são necessários muitos estudos para esclarecer todos os aspectos funcionais da interação de BLyS com seus receptores. Entretanto, seu papel crítico na modulação da resposta imune humoral parece incontestável, bem como as possíveis implicações dos produtos de variantes alélicas na modulação da auto-imunidade. Portanto, polimorfismos genéticos de BLyS são bons candidatos a conferirem maior susceptibilidade e/ou resistência ao pênfigo foliáceo endêmico.

2.4.2.1 Polimorfismos em *BLYS* e estudos de associação

O gene *BLYS* está localizado em 13q32-q34 (SCHNEIDER, 1999), que é uma região de susceptibilidade a doenças auto-imunes (BECKER *et al.*, 1998). A região transcrita compreende 6 exons e 5 introns (Figura 5).

Até o presente, triagem genômica em busca de variabilidade no gene *BLYS* só foi realizada na população japonesa. KAWASAKI *et al.* (2002) triaram as regiões codificadora, 5' e 3' não-traduzidas e região promotora de *BLYS* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide (AR) e indivíduos saudáveis e

encontraram seis posições variáveis: quatro na região promotora, uma no íntron 1 e uma substituição não-silenciosa rara no exon 1. Os SNP identificados na região promotora foram: -1283G,A, -871G,T, -514T,C e -353G,C. No intron 1 a variante está na posição IVS1-45C,G e no exon 1 na posição 313G,A (Ala105Thr) (FIGURA 2.4.2).

Os mesmos pesquisadores também fizeram análise de associação destas variantes, estudando LES (n = 156) e AR (n = 221) na população japonesa. Não foram encontradas associações das variantes com qualquer das doenças. Entretanto, o nível de RNAm de BLYS em monócitos de indivíduos saudáveis que possuem o alelo T foi significativamente mais elevado quando comparado com indivíduos sem o alelo T ($P = 0,010$).

Neste trabalho, optou-se por analisar dois dos seis SNP, baseando-se em suas possíveis implicações funcionais: -817C,T da região promotora e 313G,A (Ala105Thr) do exon 1.

A posição -871 está dentro de um sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1, e pode modular os níveis de RNAm de BLYS. Já a variante não-silenciosa Ala105Thr (313G,A) do exon 1 está localizada entre a região transmembrânica e o sítio de clivagem da molécula (que pode existir na forma solúvel) e permanece na superfície da célula. Portanto, há a possibilidade de que este polimorfismo esteja associado com a eficiência de clivagem (KAWASAKI *et al.*, 2002). Se há alguma consequência funcional dessa eficiência, não é sabido. Entretanto, se for encontrada associação positiva e/ou negativa dessa variante com o PFE, isto seria um bom indício dessa implicação funcional. Além disso, embora não tenha alcançado significância estatística, houve tendência de aumento da variante 105Thr em pacientes com AR, sugerindo que esta mutação não-silenciosa possa estar conferindo uma maior susceptibilidade à AR em uma pequena proporção de pacientes.

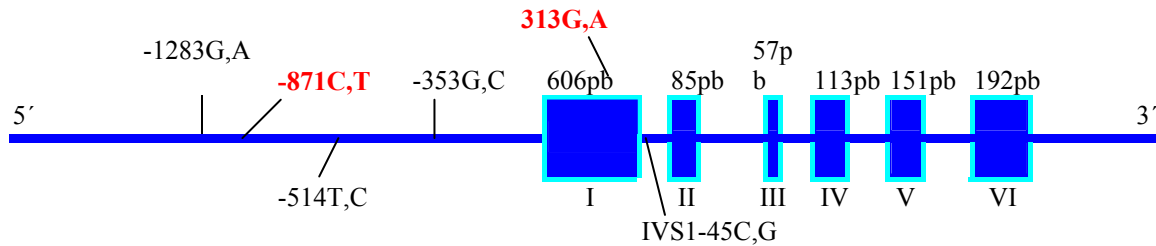


FIGURA 2.4.2 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE *BLYS* E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS POR KAWASAKI *ET AL.* (2002). EM VERMELHO SÃO DESTACADOS OS SNP ESTUDADOS NESTE TRABALHO.

2.4.3. *CD19*, o gene que codifica uma molécula crítica na manutenção da tolerância periférica

Da mesma maneira que células T necessitam dos co-receptores CD4 e CD8 para que seja obtida uma sinalização ideal por meio do complexo receptor de células T (TCR), células B também possuem co-receptores com esta função. A sinalização dos receptores de células B (BCR) é aumentada por um complexo de moléculas de superfície celular: CD19, CD21 (CR2) e CD81 (TAPA-1).

Uma das maneiras pelas quais esse complexo pode ser co-ligado ao BCR é por meio de um antígeno que tenha ativado o complemento. A molécula CD21 é um receptor para o componente C3d do complemento, de forma que os antígenos, como peptídeos derivados de patógenos, que ativaram o complemento diretamente ou por meio da ativação de anticorpo podem fazer ligação cruzada com o CD21. Isso induz a fosforilação da cauda citoplasmática de CD19, possibilitando que o sinal de ativação seja transduzido. Entretanto, parece que CD19 contribui para a sinalização mesmo na ausência de co-ligação com CD21. A ativação de células B, que é experimentalmente induzida pela ligação cruzada do BCR com anticorpos anti-receptores, é acompanhada pela co-agregação de CD19. Em contraste, células de camundongos que não possuem CD19 falham em proliferar em resposta à ligação cruzada do BCR e não ativam completamente as rotas de sinalização intracelular geradas normalmente quando o

BCR é engajado (JANEWAY e TAVERS, 1997). Esses experimentos sugerem que CD19 pode associar-se com o BCR, tanto constitutivamente como após a ativação do receptor. O papel de CD81 ainda é desconhecido.

A importância fisiológica de CD19 é demonstrada em camundongos geneticamente deficientes para essa molécula; esses animais produzem respostas B pobres para a maioria dos antígenos (RICKERT *et al.*, 1995). Em contraste, camundongos transgênicos, que superexpressam CD19, são hiper-responsivos a sinais transmembrânicos, têm resposta imune humoral elevada e mostram alterações graves durante os estágios iniciais de desenvolvimento da célula B, os quais levam a números diminuídos de células B no *pool* periférico (SATO *et al.*, 1996).

Pequenas mudanças nos níveis de CD19 expresso por células B, durante a maturação destas células, podem ter um impacto considerável sobre respostas funcionais a sinais transmembrana. É possível que superexpressão de CD19 possa imitar uma ligação do complexo CD19 aumentada na superfície celular e assim intensificar a frequência de eventos de sinalização intracelular que estabelecem os limiares de transdução de sinais para outros receptores (TEDDER *et al.*, 1997). Uma das consequências deste efeito é que CD19 pode regular a seleção negativa dependente de antígeno em células B imaturas durante maturação na medula óssea. Antes de deixarem a medula, a tolerância imunológica de células B a antígenos próprios é obtida, em parte, pela deleção clonal de células B imaturas, que expressam receptores IgM de alta afinidade e reativos a antígenos próprios. A seleção também depende da existência de limiares desencadeadores para sinais intracelulares, que são influenciados pela valência e concentração do antígeno, bem como pela afinidade do receptor. Neste contexto, expressão aumentada de CD19 pode levar à superprodução de sinais intracelulares, que excedem o limiar de sinalização, os quais podem resultar em regulação negativa do desenvolvimento de células B imaturas. Isto pode explicar a diminuição do número de células B na medula óssea e na periferia desses camundongos. Portanto, superexpressão de CD19 altera o limiar de sinais de transdução e deixa a célula B mais susceptível a sinais transmembrana. Esta situação

mimetiza a sinalização crônica, que ocorre em células B expostas a auto-antígenos *in vivo* (TEDDER *et al.*, 1997).

Experimentos *in vitro* também têm indicado o papel de CD19 na ativação e regulação do desenvolvimento de células B. Em células B maduras, a ligação cruzada de CD19 com o BCR ou CD40 ou CD72 gera sinais transmembrana sinérgicos maiores que aqueles gerados através de cada receptor individualmente (CARTER *et al.*, 1992). Além disso, CD19 é rapidamente fosforilado após a ligação do BCR, CD40 ou CD72. Portanto, CD19 serve como um componente regulador central interagindo com múltiplas vias sinalizadoras.

Em suma, o complexo receptor de células B é a única classe de receptor que estabelece a magnitude e conseqüências de outros sinais transmembrana. Pequenas mudanças no limiar de sinalização regulado por CD19 pode alterar significativamente a susceptibilidade do hospedeiro a infecções e ao desenvolvimento da auto-imunidade.

2.4.3.1 Polimorfismos em *CD19* e estudos de associação

O gene *CD19* está localizado em 16p11.2, região esta que foi identificada como sendo de susceptibilidade à artrite reumatóide (AR) e doença de Crohn.

A região transcrita compreende 15 exons e 14 introns KUROKI *et al.* (2002) fizeram uma triagem genômica do gene em uma amostra da população japonesa, que incluiu indivíduos saudáveis e pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), AR e doença de Crohn. Foram identificados 9 SNPs: 4 na região promotora, 3 em exons (1 não-sinônimo) e 2 em introns; e uma repetição dinucleotídica GT na região 3'UTR (FIGURA 2.4.3).

Estudos de associação destas variantes com LES (n = 87), AR (n = 127), doença de Crohn (n = 156) mostraram associações negativas com os alelos IVS14-30T e 705T (P235P), e associação positiva com repetições GT maiores ou iguais a 15 em pacientes com LES. Não foram encontradas associações com AR e doença de Crohn (KUROKI *et al.*, 2002).

O nível de RNAm de CD19 em células B foi mais baixo em indivíduos possuindo alelos GT₍₁₅₋₁₈₎ comparados com aqueles sem estes alelos; entretanto não foi alcançada significância estatística. Os pesquisadores sugerem que esta pequena redução no nível de RNAm esteja associada com o alongamento da repetição GT, ou com um alelo em outro loco em desequilíbrio de ligação com *CD19*. Já os outros dois SNP associados negativamente com LES provavelmente estão em desequilíbrio de ligação com outro marcador, desde que codificam para uma substituição sinônima e uma substituição em um íntron.

Neste trabalho, foi analisado apenas o SNP -30C,T, tendo em vista que já foi identificada associação deste com outra doença auto-imune. Os SNP localizados na região promotora, não são considerados sítios importantes para ligação de fatores de transcrição.

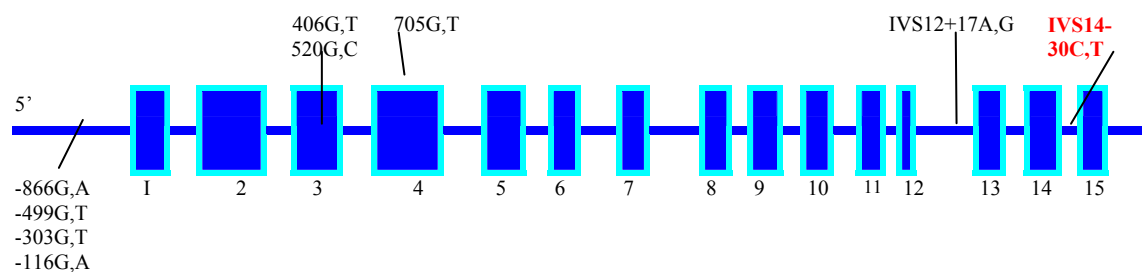


FIGURA 2.4.3 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE *CD19* E LOCALIZAÇÃO DOS SNP DESCRITOS POR KIROKI *et al.* (2002). EM VERMELHO É DESTACADO O SNP ANALISADO NESTE TRABALHO.

2.4.4. Relacionamento funcional entre as moléculas CD40, BLYS e CD19

Os centros germinativos são locais em tecidos linfóides secundários, no qual ocorre intensa proliferação, seleção, maturação e morte de células B durante respostas

imunes humorais. Os centros germinativos se formam em torno de redes de células dendríticas foliculares (FDC), as quais são especializadas em capturar e apresentar antígenos para as células B (JANEWAY e TRAVERS, 1997). As interações entre as células B e as FDC requerem dois sinais distintos, mas sinérgicos. O primeiro sinal, é fornecido pela ligação do receptor de antígeno da célula B (BCR) ao antígeno, e é responsável pela especificidade do anticorpo secretado. O segundo sinal é derivado do complexo co-receptor da célula B, sendo que um componente principal desse complexo é CD19. A expressão de CD19 está sob controle direto de fator de transcrição PAX5, específico de células da linhagem mielóide. A ligação de CD19 ao BCR diminui o limiar de sinalização para os estímulos dependentes do BCR e aumenta a proliferação de células B. Foi demonstrado que as FDC nos centros germinativos dos nódulos linfáticos humanos expressam BLYS, e que a estimulação de BLYS aumenta sinérgicamente a sinalização para as células B por meio do BCR, através de um aumento na capacidade de fosforilar de CD19 (HASE *et al.*, 2004). Este aumento é o resultado da intensificação da expressão de PAX5. Além disso, foi demonstrado que após a interação FDC-célula B induzida por BLYS, as células B aumentam a expressão de CD40 e tornam-se susceptíveis a CD40L, expresso sobre células T ativadas.

Coletivamente, estes dados demonstram a interação das vias sinalizadoras de células B, representadas por CD19, BLYS e CD40 (FIGURA 2.4.4).

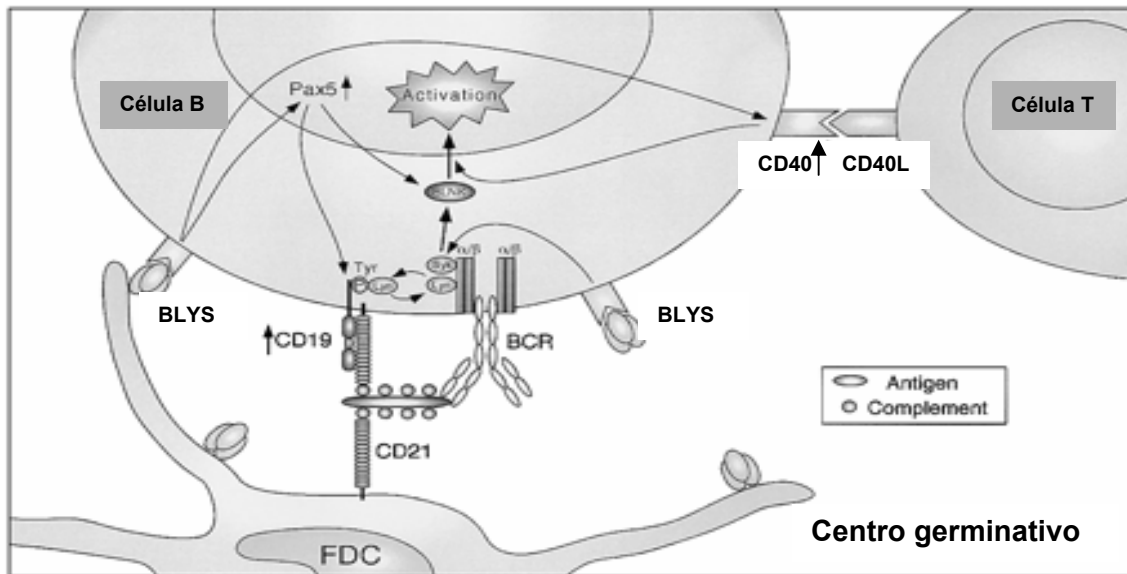


FIGURA 2.4.4 – ESQUEMA PROPOSTO PARA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B NOS CENTROS GERMINATIVOS (MODIFICADO DE HASE *et al.*, 2004). AS CÉLULAS B NOS CENTROS GERMINATIVOS RECEBEM SINAIS DE ATIVAÇÃO POR CÉLULAS DENDRÍTICAS FOLICULARES (FDC) ATRAVÉS DO BCR E DO COMPLEXO CO-RECEPTOR DE CÉLULA B. AS RESPOSTAS DE CÉLULAS B SÃO INTESIFICADAS POR BLYS, QUE AUMENTA A EXPRESSÃO DE PAX5, UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUE AUMENTA A CAPACIDADE DO BCR EM FOSFORILAR CD19, O QUE AMPLIFICA A SINALIZAÇÃO PELO BCR. ALÉM DISSO, O AUMENTO DA EXPRESSÃO DE CD40 POR BLYS TORNA AS CÉLULAS B MAIS SENSÍVEIS À CD40L EXPRESSO SOBRE AS CÉLULAS T.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

As causas da auto-imunidade ainda são pouco compreendidas. Estudos que identificam genes e alelos envolvidos na patogênese fornecem dados sobre os fatores que estão influenciando o estabelecimento da doença. Estudos sobre o pênfigo contribuem para o entendimento das doenças auto-imunes em geral.

CD40, BLyS e CD19 interagem em várias vias sinalizadoras, modulando a resposta imune humoral, induzindo proliferação e diminuição da apoptose das células B. Níveis elevados destas moléculas foram correlacionados com distúrbios auto-imunes em camundongos e em humanos. Polimorfismos genéticos destas moléculas podem contribuir para estes níveis alterados e podem, conseqüentemente, acentuar ou diminuir a susceptibilidade a doenças auto-imunes, como o pênfigo foliáceo endêmico, o que pode ser revelado por estudos de associação caso-controle.

Variantes em genes candidatos são geralmente selecionadas para estudo com base em suas frequências alélicas e possíveis efeitos funcionais. Pode-se ainda, considerar a possibilidade de ocorrência de desequilíbrio de ligação entre a posição variável em estudo e o alelo causal, mesmo que não haja indícios de qualquer significado funcional (REBBECK *et al.*, 2004). Apesar de nos genes em estudo existirem várias posições variáveis, foram escolhidas para análise posições que atendem os requisitos mencionados.

De acordo com o exposto acima, os objetivos específicos desse projeto são:

- I. Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de variantes nos genes *CD40*, *BLYS* e *CD19* nas duas subamostras populacionais analisadas nesse trabalho (Euro-Brasileira e Afro-Brasileira), nas quais elas ainda não foram estudadas;
- II. Identificar possíveis associações entre variantes destes genes com o pênfigo foliáceo endêmico.
- III. Analisar possíveis efeitos de interação gênica sobre a susceptibilidade e/ou resistência, entre os genes em estudo e outros genes previamente analisados, que desempenham função importante nas respostas imunes, e para os quais já foram identificadas associações com o PFE em nossa população (*IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1*).

Além destes, os objetivos gerais são:

- IV. Contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos no desencadeamento de doenças auto-imunes.
- V. Fornecer subsídios para a elaboração de melhores estratégias de tratamento e prevenção.
- VI. Contribuir para o conhecimento da diversidade de genes relacionados à resposta imune.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Um total de 147 indivíduos compôs a amostra de pacientes (há uma pequena variação numérica entre os diferentes genes analisados). Amostras de DNA de 20 indivíduos foram coletadas em 1988 no Hospital de Dermatologia Sanitária de Piraquara (PR); 80 entre 1997 e 1998 e 47 amostras entre 2002 e 2003, no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande/MS).

A amostra de indivíduos-controle é composta 290 indivíduos (também há uma pequena variação entre os diferentes genes analisados). Esses indivíduos foram contatados em diferentes locais: na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (amostras de sangue coletadas em 1997 e 1998, em número de 35); no Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande/MS (amostras coletadas entre 1997/98 e 2002/03, em número de 142) e no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (amostras coletadas entre 1987 e 2002, em número de 113). Esses indivíduos foram incluídos na amostra na medida em que puderam ser pareados com os pacientes no que diz respeito à origem étnica, geográfica e ocupação.

A amostra populacional estudada é etnicamente heterogênea (miscigenada) e não panmítica. Portanto, os diferentes estratos populacionais podem diferir quanto às frequências alélicas. Considerando-se a necessidade de parrear as amostras de pacientes e controles por ancestralidade, e o interesse das análises de associação nas sub-populações, os indivíduos foram classificados de acordo com características morfológicas faciais. Essa classificação permite, dentro dos limites da abordagem, estimar a contribuição relativa de ancestrais europeus e africanos para cada genoma individual. A classificação foi baseada na forma do nariz, boca e olhos, tipo do cabelo e coloração da pele. Duas sub-amostras resultaram desta classificação: amostra populacional de origem predominantemente européia, doravante denominada Euro-Brasileira, com 82 pacientes e 232 controles, e amostra populacional mestiça, de origem predominantemente africana e européia, que será denominada Afro-Brasileira (AF), com 65 pacientes e 58 controles. Na amostra EU foram incluídos indivíduos nos

quais o componente de ancestralidade africana, se existente, não era visível morfológicamente. Na amostra AF foram incluídos indivíduos mulatos claros (ancestralidade principalmente européia, mas com componente africano visível), mulatos médios (contribuição aproximadamente igual de ancestrais europeus e africanos) e mulatos escuros e negros (ancestralidade predominantemente africana). Dentre os mulatos claros 13,0% eram pacientes e 12,5% controles; nos mulatos médios 40,7% eram pacientes e 39,3% controles e nos mulatos escuros e negros 46,3% eram pacientes 48,2% controles.

Os pacientes e os indivíduos-controle foram submetidos a um questionário, no qual foram obtidas informações relevantes para o pareamento dos indivíduos quanto ao sexo e grupo étnico, bem como informações sobre o ambiente e condições de vida.

O local geográfico de aparecimento da lesão primária característica do PFE é mostrado em porcentagem do número e casos por região do território brasileiro (FIGURA 4.1). Existem algumas diferenças com relação à distribuição da ocupação entre pacientes e controles: 8,8% e 18,8% dos pacientes são estudantes e do lar, respectivamente; enquanto estes números são de 1% e 4,5% nos indivíduos-controle (FIGURA 4.2). Entretanto, 66% dos pacientes estudantes e 62,5% dos pacientes do lar moram e exercem atividades em áreas rurais. Com relação ao grau de instrução, a distribuição é semelhante entre pacientes e controles (FIGURA 4.3). A faixa etária na qual apareceram as primeiras lesões características do PFE são mostradas na FIGURA 4.4. A proporção sexual entre pacientes e controles é próxima a 1:1, bem como a distribuição de casos entre indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino (FIGURA 4.5).

Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto ao objetivo e perspectivas do estudo e assinaram um termo de consentimento de participação voluntária. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR.

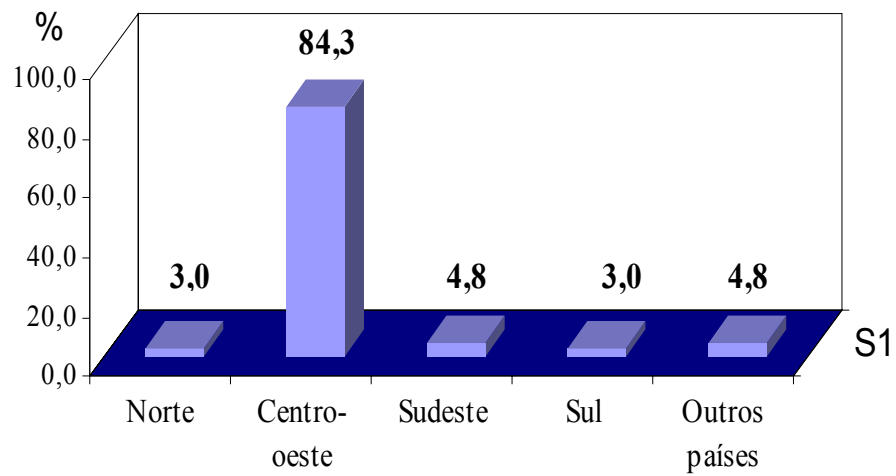


FIGURA 4.1 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DAS REGIÕES DO TERRITÓRIO BRASILEIRO NAS QUAIS OCORREU INÍCIO DE MANIFESTAÇÃO DAS LESÕES CARACTERÍSTICAS DO PFE.

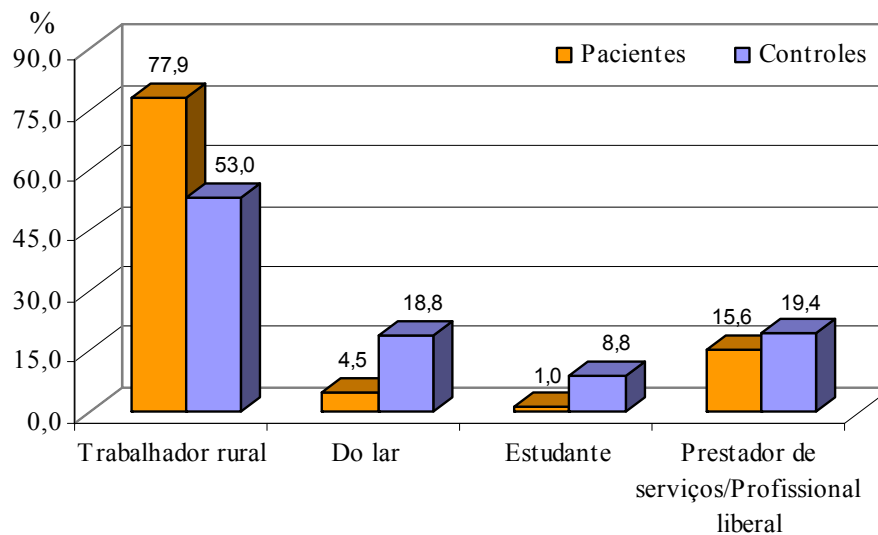


FIGURA 4.2 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DAS ATIVIDADES OCUPACIONAIS EM PACIENTES E CONTROLES.

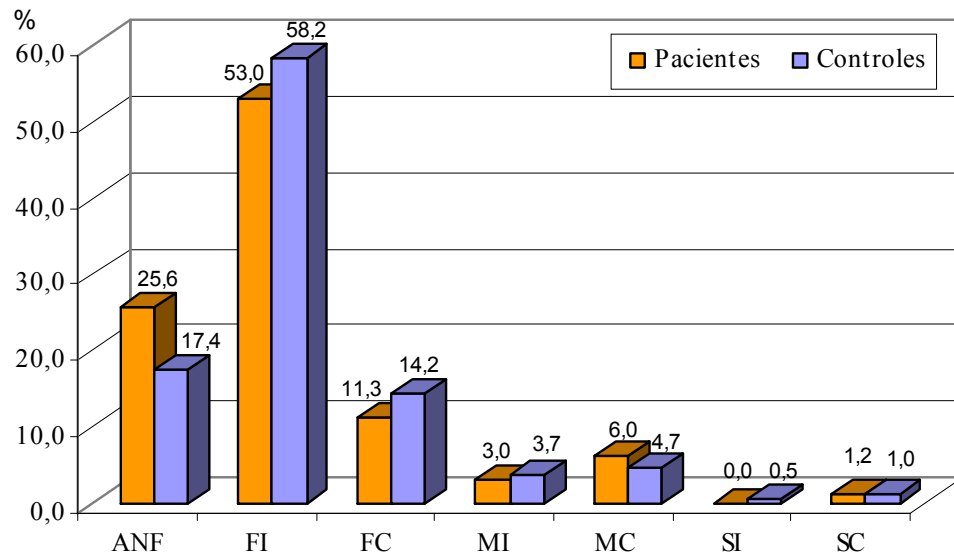


FIGURA .4.3 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO GRAU DE INSTRUÇÃO EM PACIENTES E CONTROLES (ANF – ANALFABETOS; FI, MI E SI – ENSINOS FUNDAMENTAL, MÉDIO E SUPERIOR INCOMPLETOS, RESPECTIVAMENTE; FC, MC E SC – ENSINOS FUNDAMENTAL, MÉDIO E SUPERIOR COMPLETOS, RESPECTIVAMENTE).

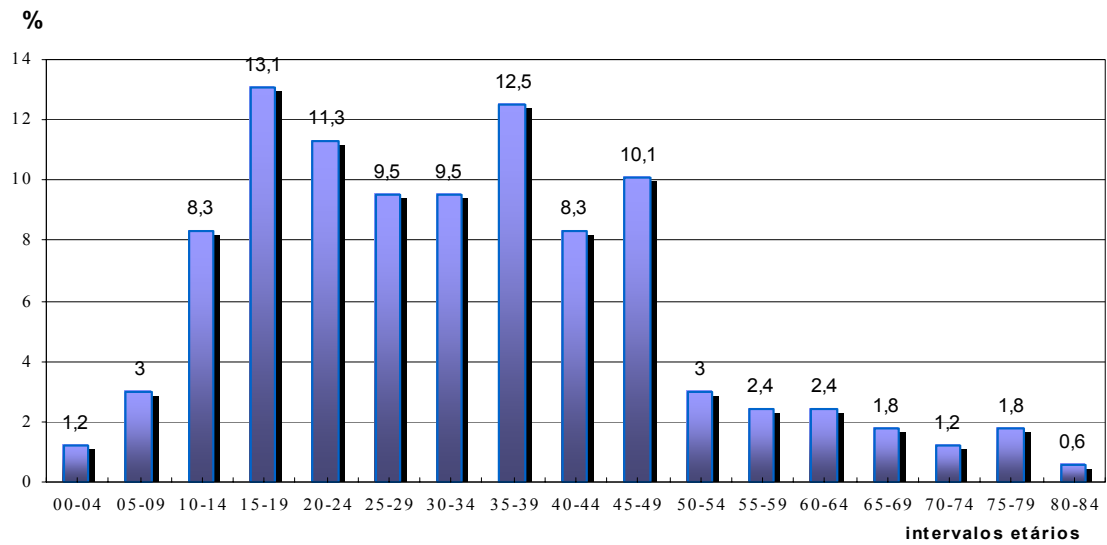


FIGURA 4.4 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DA FAIXA ETÁRIA NA QUAL HOVE O APARECIMENTO DA LESÃO CARACTERÍSTICA DO PFE.

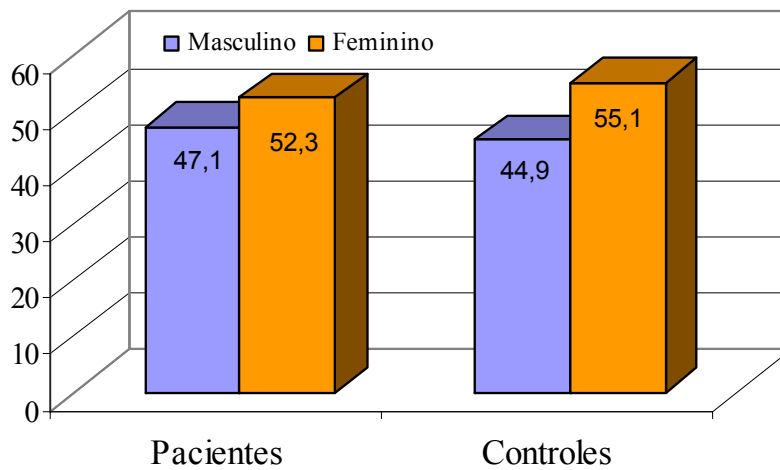


FIGURA 4.5 - DISTRIBUIÇÃO SEXUAL ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Duas técnicas foram empregadas na extração do DNA das amostras: a que utiliza fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK *et al.*, 1989) e a técnica de *salting-out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

4.3. TIPAGENS GÊNICAS

4.3.1. Genotipagem de *CD40* -1(C,T)

O SNP –1C,T de *CD40* foi genotipado pela técnica de PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), com a endonuclease de restrição *Eco130I*.

A amplificação de uma sequência de 309 pb da região promotora que contém esse SNP foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

- a montante: 5'-CCTCTTCCCCGAAGTCTTCC-3'
- a jusante: 5'-GAAACTCCTGCGCGGTGAAT-3'

A mistura de reação da PCR era composta de tampão 1X (Tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); MgCl₂ 3,0 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,5 U de Taq polimerase (CENBIOT); 50 µg de DNA e H₂O q.s.p. 12,0 µL.

As amplificações foram feitas no termociclador PTC-200 (MJ Research). Utilizou-se um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

O tamanho dos produtos amplificados era de 309 pb e foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, para verificação da qualidade da amplificação.

Em seguida foi feita a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *Eco130I*. A mistura de reação era composta de tampão 1,5X (O^+), 8,0 μ L do produto de PCR, *Eco130I* 10,0 U e H_2O q.s.p 12,0 μ L. As digestões foram realizadas no termociclador PTC-100 (MJ Research), mantendo-se a temperatura de 37°C por 2 horas.

Os resultados das digestões foram analisados em gel de agarose 4%, corados com brometo de etídeo (FIGURA 4.3.1). A enzima cliva o fragmento amplificado em duas posições, a variável e uma monomórfica. A presença de um sítio de restrição adicional representa uma maneira de se obter maior confiabilidade nos resultados, uma vez que a ausência de clivagem neste sítio indica a falha da enzima.

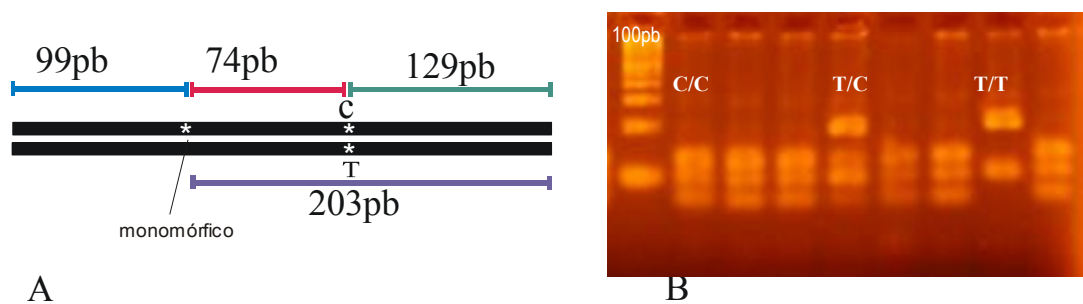


FIGURA 4.3.1 - (A) LOCALIZAÇÃO DO SNP –1C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM O ALELO C E O SÍTIO MONOMÓRFICO SÃO CLIVADOS PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO TRÊS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C). * INDICAM OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.

4.3.2 Genotipagem de *BLYS*

4.3.2.1. SNP -871(C,T)

O SNP –871C,T de *BLYS* também foi genotipado pela técnica de PCR-RFLP, com a endonuclease de restrição *Mbi*I. Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do segmento que contém a posição variável foram:

- a montante: 5'- GCAGTCAGGCATTTGGAGCTG -3'
- a jusante: 5'-TGGGACTCATCACTGAAACTCA -3'

A mistura de reação da PCR era composta de tampão 1X (Tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); MgCl₂ 3,0 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,15 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,72 U de Taq polimerase (CENBIOT); 60 µg de DNA e H₂O q.s.p. 12,0 µL.

As amplificações foram feitas no termociclador PTC-200 (MJ Research). Utilizou-se um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

O tamanho dos produtos amplificados era de 162 pb e foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para análise da qualidade da amplificação.

Em seguida foi feita a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *Mbi*I. A mistura de reação foi composta de tampão 1X (Y⁺), 8,0 µL do produto de PCR, *Mbi*I 1,2 U e H₂O q.s.p 13,0 µL. A digestão foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 2 horas.

Os resultados das digestões foram analisados em gel de agarose 4% corado com brometo de etídeo (FIGURA 4.3.2)

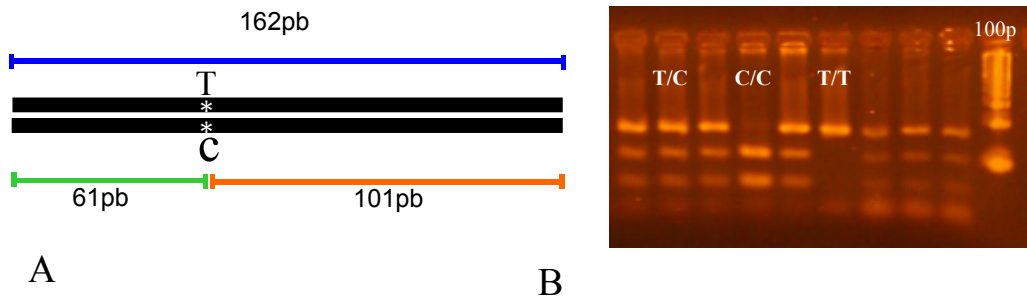


FIGURA 4.3.2 - (A) LOCALIZAÇÃO DO SNP -871C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM O ALELO C É CLIVADO PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO DOIS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C). *SÍTIO DE RESTRIÇÃO.

4.3.3.2. SNP 313(G,A)

A posição variável não-silenciosa 313G,A (Ala105Thr) do exon 1 de *BLYS* foi genotipada através da técnica de PCR-SSCA (polimorfismo de conformação de fita simples), na qual as fitas da molécula de DNA são desnaturadas e submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação foram:

- a montante: 5' - AGTCACGCCTTACTTCTTGC -3'
- a jusante: 5' -AAGACGCAGGCAAGATCCT -3'

A mistura de reação da PCR foi composta de tampão 1X (Tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); MgCl₂ 2,0 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1U de Taq polimerase (CENBIOT); 80 µg de DNA e H₂O q.s.p. 25,0 µL.

As amplificações foram feitas no termociclador PTC-200 (MJ Research). Utilizou-se um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

O tamanho dos produtos amplificados foi de 351 pb e analisados em gel de poliacrilamida, por meio da técnica de SSCA (single strand conformational analysis) (FIGURA 4.3.3). A concentração do gel era de 8% (T = 8%), sendo a concentração da solução estoque de acrilamida:bisacrilamida 49:1 (G = 0,02), respectivamente; glicerol 5% e tampão TBE 1X q.s.p. 25mL. A polimerização utilizou 1% de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED. As corridas eletroforéticas duravam 5 horas a amperagem constante de 20mA. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata 0,02%.

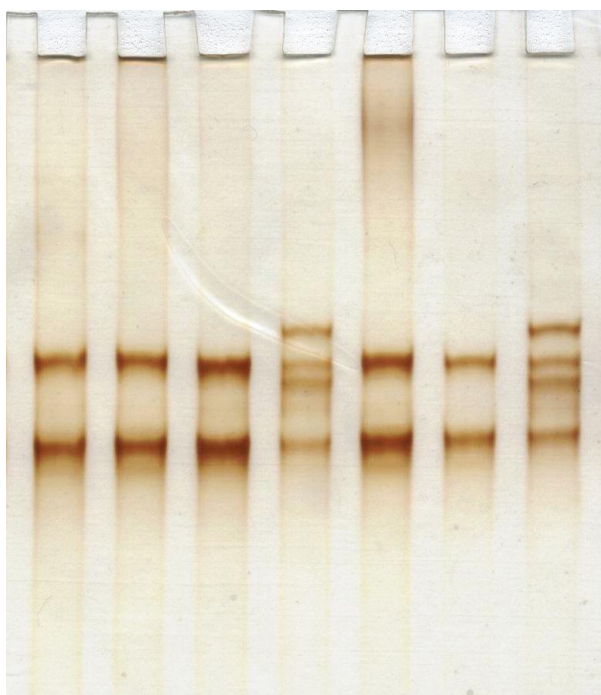


FIGURA 4.3.3 – GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO O PADRÃO DE BANDAS OBTIDO POR MEIO DA TÉCNICA DE SSCA, PARA *BLYS 313(G/A)*. DUAS BANDAS REPRESENTAM OS HOMOZIGOTOS G/G E QUATRO BANDAS OS HETEROZIGOTOS G/A.

4.3.4 Genotipagem de *CD19*

O SNP -30C,T de *CD19* foi genotipado pela técnica de PCR-RFLP, com a endonuclease de restrição *BamHI*. Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do segmento que contém a posição variável foram:

- a montante: 5' - AGAGGGAACAGGGTTCCTAG - 3'
- a jusante: 5' - TAAGGAATACAAAGGGGACTGG -3'

A mistura de reação da PCR foi composta de tampão 1X (Tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); MgCl₂ 2,0 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,5 U de Taq polimerase (CENBIOT); 50 µg de DNA e H₂O q.s.p. 12,0 µL.

As amplificações foram feitas no termociclador PTC-200 (MJ Research). Utilizou-se um passo inicial de 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

O tamanho dos produtos amplificados era de 333 pb e foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para análise da qualidade da amplificação.

Em seguida foi feita a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *BamHI*. A mistura de reação foi composta de tampão 1X (*BamHI*⁺), 8,0 µL do produto de PCR, *BamHI* 2,0 U e H₂O q.s.p 12,0 µL. A digestão foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 2 horas.

Os resultados das digestões foram analisados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo (FIGURA 4.3.4)

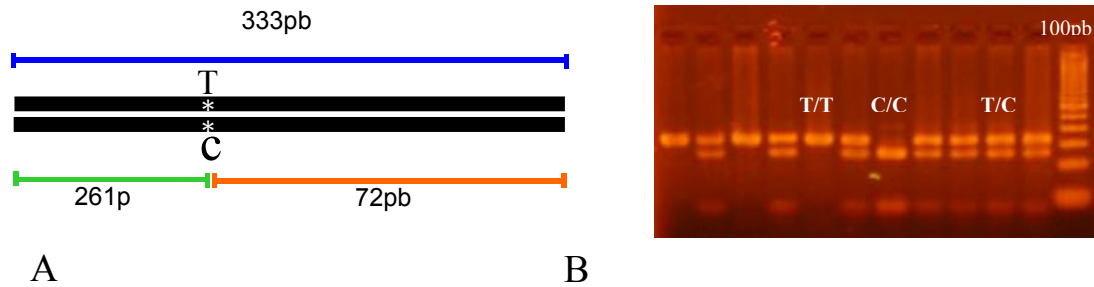


FIGURA 4.3.4. (A) LOCALIZAÇÃO DO SNP –30C,T NO FRAGMENTO AMPLIFICADO POR PCR, MOSTRANDO QUE O FRAGMENTO QUE CONTÉM O ALELO C É CLIVADO PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO, ORIGINANDO DOIS FRAGMENTOS. (B) PADRÃO DE BANDAS OBTIDO APÓS ELETROFORESE, PARA OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS (T/T, T/C E C/C). *SÍTIO DE RESTRIÇÃO.

4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se os dois sub-grupos étnicos separadamente.

As frequências genóticas para cada variante foram obtidas pelo programa CONVERT 1.1. (PROBST, 1998), o qual gera o arquivo de entrada de dados para o pacote de programas ARLEQUIN 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Através desse pacote de programas foram obtidas as frequências alélicas para cada SNP, bem como foi testado se as frequências genóticas obtidas diferem das esperadas segundo o teorema de Hardy-Weinberg (através do método de GUO e THOMPSON, 1992). A frequência de indivíduos portadores de cada variante foi obtida por contagem direta.

As frequências genóticas, alélicas e de indivíduos portadores de determinado alelo foram comparadas entre pacientes e controles através do teste exato de Fisher em tabelas de contingência 2X2, utilizando o programa computacional RXC (MILLER, 1997). Diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles são reveladas por valores de *P* inferiores a 0,05, indicando associação positiva ou negativa da variante com a doença.

Para cada alelo e genótipo, foi estimada uma razão de probabilidade (OR), obtida através da fórmula $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOOLF, 1955), sendo os valores A, B, C e D obtidos da tabela:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

Os valores da OR refletem o risco relativo (RR), ou seja, a chance que os portadores de determinado fator têm de desenvolver a patologia, em relação aos indivíduos que não possuem o fator. O valor correspondente a 1 unidade significa que a probabilidade é a mesma para indivíduos que tem e que não tem o fator. Valores acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença e, valores abaixo de 1, indicam uma menor probabilidade.

As análises de interação gênica foram realizadas conforme SVEJGAARD e RYDER (1994), com modificações no enfoque das questões investigadas. Nestas análises, são comparadas a presença e ausência dos fatores em questão. Os dados básicos para as análises foram obtidos conforme demonstrado na TABELA 4.1. Estes dados representam as frequências das quatro combinações fenotípicas dos dois fatores (genes) analisados. O mesmo fator é considerado positivo numa análise e negativo na outra. Por exemplo, se o gene 1 tem um SNP cujas posições variáveis são ocupadas por C ou T e o gene 2 também tem um SNP ocupado por C ou T, as combinações possíveis para análise são:.

- (i) Considerar C como positivo para o gene 1 e C como positivo para o gene 2;
- (ii) Considerar T como positivo para o gene 1 e T como positivo para o gene 2;
- (iii) Considerar C como positivo para o gene 1 e T como positivo para o gene 2;
- (iv) Considerar T como positivo para o gene 1 e C como positivo para o gene 2.

TABELA 4.1 - FREQUÊNCIAS DAS QUATRO COMBINAÇÕES FENOTÍPICAS PARA OS DOIS GENES ANALISADOS (FATOR A E FATOR B), COM RELAÇÃO À PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DETERMINADA POSIÇÃO VARIÁVEL.

Fator A	Fator B	Número de	
		Pacientes	Controles
+	+	x1	y1
+	-	x2	y2
-	+	x3	y3
-	-	x4	y4

Também foram comparadas entre pacientes e controles, as frequências de indivíduos portadores de cada genótipo na presença e ausência do fator no segundo gene (TABELA 4.2). Estes dados foram obtidos através das combinações genotípicas entre os dois fatores geradas pelo programa CONVERT 1.1. (PROBST, 1998).

As comparações realizadas combinando-se os genótipos do gene *HLA-DRB1* e os dos genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*, foram feitas considerando o efeito fenotípico do genótipo *HLA-DRB1* e o critério 3 de PAVONI *et al.* (2003), para categorização dos alelos em protetores, de susceptibilidade e neutros. Segundo este critério, são considerados alelos de susceptibilidade ou resistência apenas aqueles cujas diferenças das frequências entre pacientes e controles têm uma probabilidade menor que 1% de serem atribuídas ao acaso. Já o efeito fenotípico dos genótipos foi estabelecido com base nas interações alélicas

Dessa maneira, as análises combinadas foram realizadas isolando-se o efeito fenotípico dos alelos de *HLA-DRB1*, ou seja, analisou-se o efeito de cada fenótipo – susceptibilidade, protetor e neutro – na presença e na ausência de cada fator dos genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*, e também no contexto de cada genótipo destes genes (TABELA 4.3).

Todos os dados básicos foram submetidos a testes a partir de tabelas de contingência 2x2 (TABELA 4.4). Para cada comparação entre pacientes e controles, foi obtido o valor de *P* através do teste exato de Fisher e a OR.

TABELA 4.2 - MODELO DAS TABELAS UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DE INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E PORTADORES DE DETERMINADO ALELO.

Genótipo A	Fator B		Genótipo A	Fator B	Número de	
					Pacientes	Controles
+/+	+	vs.	+/+	-	b1	b2
+ / -	+	vs.	+ / -	-	b3	b4
- / -	+	vs.	- / -	-	b5	b6
Fator A	Genótipo B		Fator A	Genótipo B		
+	+/+	vs.	-	+/+	c1	c2
+	+ / -	vs.	-	+ / -	c3	c4
+	- / -	vs.	-	- / -	c5	c6

Os dados brutos b1-b6 e c1-c6 foram obtidos por contagem direta a partir das frequências de combinações genotípicas entre os dois fatores.

TABELA 4.3 - MODELO DE TABELA UTILIZADA PARA ANALISAR O POSSÍVEL EFEITO DO FENÓTIPO DO FATOR B (VARIANTES DOS GENES *CD40*, *BLYS* E *CD19*) NA AMOSTRA ESTRATIFICADA PARA OS FENÓTIPOS DE *HLA-DRB1*.

Fenótipo HLA-DRB1	Fator B	Número de	
		Pacientes	Controles
SUS	+	d1	d2
SUS	-	d3	d4
PRO	+	e1	e2
PRO	-	e3	e4
NEU	+	f1	f2
NEU	-	f3	f4

Os dados brutos d1-f4 foram obtidos por contagem direta a partir das frequências de combinações genóticas entre os dois fatores. SUS – susceptibilidade, PRO – protetor, NEU – neutro.

TABELA 4.4 - MODELO DAS TABELAS DE CONTINGÊNCIA PARA COMPARAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS A RESPEITO DAS POSSÍVEIS FORMAS DE INTERAÇÃO GÊNICA, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

Comparação	Entradas da tabela 2 x 2			
	a	b	c	d
++ vs. -+	x1	x2	y1	y2
+ - vs. --	x3	x4	y3	y4
++ vs. +-	x1	x2	y1	y2
-+ vs. --	x3	x4	y3	y4
++ vs. --	x1	x4	y1	y4
++ vs. demais combinações	x1	y1	x2 + x3 + x4	y2 + y3 + y4
+ - vs. demais combinações	x2	y2	x1 + x3 + x4	y1 + y3 + y4
- + vs. demais combinações	x3	y3	x1 + x2 + x4	y1 + y2 + y4
- - vs. demais combinações	x4	y4	x1 + x2 + x3	y1 + y2 + y3

Os números entre colchetes são referentes às seguintes perguntas:

[1] Fator A+ está associado em indivíduos com o Fator B+?

[2] Fator A+ está associado em indivíduos com o Fator B-?

[3] Fator B+ está associado em indivíduos com o Fator A+?

[4] Fator B⁺ está associado em indivíduos com o Fator A-?

[5] Presença dos Fatores A e B tem efeito diferencial sobre a susceptibilidade e/ou resistência em relação a sua ausência?

[6]- [9] Presença simultânea de determinada combinação tem efeito diferencial sobre a susceptibilidade e/ou resistência?

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE *CD40* -1(C,T)

Foram tipados 143 pacientes (80 de origem predominantemente européia [EU] e 63 de origem predominantemente africana [AF]) e 286 indivíduos-controle (228 e 58, respectivamente).

Foram comparadas, entre pacientes e controles, as frequências alélicas, genotípicas e de indivíduos portadores da variante (TABELAS 5.11, 5.12 e 5.13, respectivamente). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para qualquer das comparações, nos dois subgrupos populacionais. Entretanto, há uma tendência de diminuição da frequência de indivíduos portadores de T em pacientes ($P = 0,0819$), na sub-amostra de origem predominantemente européia.

Tanto o grupo de pacientes quanto o de controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg – nos pacientes $P = 0,45$ (EU) e $P = 0,29$ (AF), e nos controles $P = 0,41$ (EU) e $P = 0,16$ (AF).

Como todas as frequências comparadas entre pacientes e controles não são diferentes estatisticamente, é possível reunir os dois grupos num único e obter a estimativa das frequências alélicas da população resultante. São elas: *CD40* -1T = 24,0% para a amostra de origem predominantemente européia e *CD40* -1T = 14,9% para a amostra de origem predominantemente africana.

TABELA 5.11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *CD40* -1(C,T) EM PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 80)		(n = 228)				
-1C	65	81,3	169	74,1	0,22	1,51	0,80-2,85
-1T	15	18,8	59	25,9		0,66	0,35-1,25
AF	(n = 63)		(n = 58)				
-1C	55	87,3	48	82,7	0,61	1,43	0,52-3,92
-1T	8	12,7	10	17,3		0,70	0,26-1,91

P: probabilidade; OR: “odds ratio”. IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana. Não existem diferenças significativas de frequências alélicas entre os subgrupos populacionais EU e AF ($P = 0,36$ e $P = 0,22$ em pacientes e controles, respectivamente).

TABELA 5.12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *CD40* –(1C,T) EM PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 80)		(n = 228)				
C/C	54	67,5	127	55,7	0,12	1,53	0,91-2,60
C/T	22	27,5	83	36,4	0,18	0,66	0,38-1,16
T/T	4	5,0	18	7,9	0,47	0,61	0,20-1,87
AF	(n = 63)		(n = 58)				
C/C	48	76,2	42	72,4	0,67	1,22	0,54-2,76
C/T	13	20,6	13	22,4	0,82	0,9	0,38-2,14
T/T	2	3,2	3	5,2	0,67	0,6	0,10-3,73

P: probabilidade; OR: “odds ratio”. IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana.

TABELA 5.13 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE *CD40-1* ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUB-GRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 80)		(n = 228)				
C+	76	95,0	210	92,1	0,46	1,63	0,53-4,97
T+	26	32,5	101	44,3	0,08	0,61	0,35-1,03
AF	(n = 63)		(n = 58)				
C+	61	96,8	55	94,8	1	1,66	0,27-10,33
T+	15	23,8	16	27,6	0,68	0,82	0,36-1,86

P: probabilidade; OR: “odds ratio” IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana

5.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE *BLYS*

5.2.1 Análise de Associação Individual de *BLYS* -871(C,T)

Foram tipados 147 pacientes (82 de origem predominantemente européia [EU] e 65 de origem predominantemente africana [AF]) e 290 indivíduos-controle (232 e 58, respectivamente).

Foram comparadas as frequências genóticas, alélicas e de indivíduos portadores das variantes entre pacientes e controles (TABELAS 5.21, 5.22 e 5.23, respectivamente).

As frequências alélicas, genóticas e de portadores são semelhantes entre pacientes e controles nos dois subgrupos populacionais. Portanto, os testes de associação da variante com o PFE não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles.

Tanto o grupo de pacientes quanto o de controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg – nos pacientes $P = 0,49$ (EU) e $P \approx 1$ (AF), e nos controles $P \approx 1$ (EU) e $P = 0,75$ (AF).

Como todas as frequências comparadas entre pacientes e controles não são diferentes estatisticamente, é possível reunir os dois grupos num único e obter a estimativa das frequências alélicas da população resultante. São elas: *BLYS* -871T = 38,5% para a amostra de origem predominantemente européia e *BLYS* -871T = 26% para a amostra de origem predominantemente africana.

TABELA 5.21 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *BLYS* -871(C,T) EM PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 82)		(n = 232)				
-871C	52	64,0	141	61,2	0,69	1,12	0,66-1,88
-871T	30	36,0	91	38,8		0,89	0,53-1,51
AF	(n = 65)		(n = 58)				
-871C	50	76,9	41	69,8	0,52	1,38	0,62-3,10
-871T	15	23,1	17	30,2		0,72	0,32-1,62

P: probabilidade; OR: “odds ratio” IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana. Não existem diferenças significativas de frequências alélicas entre os subgrupos populacionais EU e AF ($P = 0,10$ e $P = 0,18$ em pacientes e controles, respectivamente).

TABELA 5.2.2. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *BLYS* - 871(C,T) EM PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 82)		(n = 232)				
C/C	35	42,7	87	37,5	0,42	1,24	0,74-2,07
C/T	35	42,7	110	47,4	0,52	0,83	0,5-1,37
T/T	12	14,6	35	15,1	1	0,96	0,47-1,96
AF	(n = 65)		(n = 58)				
C/C	38	58,5	29	50,0	0,37	1,41	0,69-2,87
C/T	24	36,9	23	39,7	0,85	0,89	0,43-1,85
T/T	3	4,6	6	10,3	0,30	0,42	0,10-1,76

P: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana.

TABELA 5.2.3 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE *BLYS* -871 ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUB-GRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR (95%)	IC
	n	%	n	%			
EU	(n = 82)		(n = 232)				
C+	70	85,4	197	84,9	1	1,04	0,51-2,11
T+	47	57,3	145	62,5	0,44	0,81	0,48-1,34
AF	(n = 65)		(n = 58)				
C+	62	95,4	52	89,7	0,30	2,38	0,57-10,01
T+	27	41,5	29	50,0	0,38	0,71	0,25-1,45

P: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana.

5.2.2 Análise de *BLYS* 313(G,A)

Foram tipados 130 indivíduos-controle não afetados por PFE (106 EU, 11 AF e 11 orientais). Destes, apenas um indivíduo (EU) foi heterozigoto, sendo todos os demais homozigotos G/G.

Devido à baixa frequência alélica da variante A, 0,4% no estrato populacional de origem predominantemente européia e, sendo nossa amostra constituída principalmente deste subgrupo populacional, optou-se por não genotipar a amostra de pacientes e controles do PFE, tendo em vista a necessidade de uma amostra de tamanho maior para que pudesse ter-se poder estatístico para análise de uma variante de frequência tão baixa.

5.3.. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DE *CD19* -30(C,T)

Foram tipados 136 pacientes (77 de origem predominantemente européia [EU] e 59 de origem predominantemente africana [AF]) e 261 indivíduos-controle (213 e 48, respectivamente).

As frequências genóticas, alélicas e de indivíduos portadores das variantes foram comparadas entre pacientes e controles e são mostradas nas TABELAS 5.31, 5.32 e 5.33, respectivamente.

Também para esta posição as frequências obtidas a partir de todas as comparações são semelhantes entre pacientes e controles nos dois subgrupos populacionais. Portanto, os testes de associação desta variante com o PFE também não mostraram diferenças estatisticamente significantes. Porém, há uma tendência de aumento da frequência de indivíduos portadores de T nos pacientes ($P = 0,0736$), na sub-amostra de origem predominantemente européia.

Tanto o grupo de pacientes quanto o de controles estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg – nos pacientes $P = 0,37$ (EU) e $P = 0,07$ (AF), e nos controles $P = 0,53$ (EU) e $P = 0,65$ (AF).

Como todas as frequências comparadas entre pacientes e controles não são diferentes estatisticamente, é possível reunir os dois grupos num único e obter a estimativa das frequências alélicas da população resultante. São elas: $CD19-30C = 30,0\%$ para a amostra de origem predominantemente europeia e $CD19-30 = 21,5\%$ para a amostra de origem predominantemente africana.

TABELA 5.3.1 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *CD19* -30(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 77)		(n = 213)				
-30C	19	24,7	68	31,9	0,26	0,70	0,39-1,26
-30T	58	75,3	145	68,1		1,43	0,79-2,59
AF	(n = 59)		(n = 48)				
-30C	14	23,7	9	18,7	0,64	1,35	0,53-3,45
-30T	45	76,3	39	81,3		0,74	0,29-1,90

P: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana. Não existem diferenças significativas de frequências alélicas entre os subgrupos populacionais EU e AF ($P = 1$ e $P = 0,07$ em pacientes e controles, respectivamente).

TABELA 5.3.2 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE CD19 - 30(C,T) ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 77)		(n = 213)				
C/C	3	3,9	24	11,3	0,06	0,32	0,09-1,09
C/T	33	42,9	88	41,3	0,88	1,07	0,63-1,81
T/T	41	53,2	101	47,4	0,22	1,38	0,82-2,31
AF	(n = 59)		(n = 48)				
C/C	6	10,2	2	4,2	0,28	2,6	0,50-13,54
C/T	16	27,1	14	29,2	0,83	0,9	0,39-2,11
T/T	37	62,7	32	66,7	0,68	0,84	0,38-1,87

P: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana.

TABELA 5.3.3 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DAS VARIANTES DE CD19 -30 ENTRE PACIENTES E CONTROLES, NOS DOIS SUBGRUPOS POPULACIONAIS.

Alelo	Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC (95%)
	n	%	n	%			
EU	(n = 77)		(n = 213)				
C+	36	46,7	112	52,6	0,41	0,79	0,47-1,33
T+	74	96,1	189	88,7	0,07	3,13	0,92-10,72
AF	(n = 59)		(n = 48)				
C+	22	37,3	16	33,3	0,68	1,19	0,53-2,64
T+	53	89,8	46	95,8	0,29	0,38	0,07-2,00

P: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança; EU: sub-amostra populacional de origem predominantemente européia; AF: sub-amostra populacional de origem predominantemente africana.

5.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE INTERAÇÃO GÊNICA

Todas as análises para revelar possíveis interações gênicas modulando a susceptibilidade e/ou resistência ao PFE foram realizadas considerando-se apenas a amostra de origem predominantemente européia. Não foram feitas para a amostra de origem predominantemente africana em virtude da limitação do tamanho amostral.

Também foram realizadas análises de interação entre os genes tipados neste trabalho e outros analisados anteriormente no Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal do Paraná, para esta mesma amostra e para os quais foram identificadas associações com o PFE. São eles: *IL6* -174(G,C) e *IL4* -590(C,T) (PEREIRA *et al.*, 2004) e *HLA-DRB1* (PAVONI *et al.*, 2003).

Na tentativa de não deixar de identificar associações fracas ou mesmo tendências, optou-se por não aplicar a correção de Bonferroni aos valores de *P*. Entretanto, valores de *P* inferiores a 0,05 foram interpretados com cautela, devido ao risco de ocorrência do erro estatístico do tipo I, ou seja, rejeitar a hipótese nula, sendo ela verdadeira.

5.4.1 Análises de interação entre os genes *BLYS* e *CD40*

Foram analisados 82 pacientes e 229 indivíduos-controle.

Todos os resultados mostrados seguem a seguinte ordem: o primeiro fator é referente ao SNP -871(C,T) de *BLYS* e o segundo é referente ao -1(C,T) de *CD40*.

De todas as 46 comparações realizadas entre pacientes e controles, cinco mostram desvios estatisticamente significantes:

- I. Indivíduos C+T+ em relação a indivíduos C+ T- (TABELA 5.4);
- II. Indivíduos C+T- em relação a indivíduos portadores de todas as outras combinações (TABELA 5.5);
- III. Indivíduos T+T+ em relação a indivíduos portadores de todas as outras combinações (TABELA 5.6);

IV. Indivíduos T+T+ em relação a indivíduos T+T- (TABELA 5.7).

V. Indivíduos C/T e T+ em relação a indivíduos C/T e T- (TABELA 5.8).

Estes resultados apontam para uma tendência de diminuição das frequências das combinações C+T+ (OR = 0,52 e 0,56), T+T+ (OR = 0,47 e 0,44) e C/T e T+ (OR = 0,33) na sub-amostra de pacientes. Percebe-se que este possível efeito protetor é causado primariamente pela presença de T em *CD40*, podendo esses indivíduos serem C+ ou T+ em *BLYS*. Na análise individual, houve uma tendência de diminuição da frequência de pacientes portadores de T em *CD40* ($P = 0,08$). Se observados os genótipos desses indivíduos, os mesmos podem ser T/T ou T/C em *CD40*. Entretanto, considerando-se os genótipos de *BLYS*, a associação restringe-se aos heterozigotos. Ou seja, a associação negativa deve-se, primariamente, à combinação *CD40* -1 T+, *BLYS* - 871C/T.

TABELA 5.4 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E DE PORTADORES DE C+T- PARA OS GENES *BLYS* E *CD40*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
BLYS	CD40	n = 70	%	n = 193	%			
C+	T+	21	30,0	87	45,0	0,03	0,52	0,29-0,94
C+	T-	49	70,0	106	55,0		1,92	1,07-3,44

C+ T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) e **C+T-** = (C/T, C/C) + (C/C, C/C). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.5 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E DE PORTADORES DE TODAS AS DEMAIS COMBINAÇÕES PARA OS GENES *BLYS* E *CD40*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
BLYS	CD40	n = 82	%	n = 229	%			
C+	T+	21	25,6	87	38,0	0,04	0,56	0,32-0,99
Outras		61	74,4	142	62,0		1,78	1,01-3,13

C+ T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) e **Outras** = (C/T, C/C) + (C/C, C/C) + (T/T, C/C) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.6 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ E DE PORTADORES DE TODAS AS DEMAIS COMBINAÇÕES, PARA OS GENES *BLYS* E *CD40*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
BLYS	CD40	n = 82	%	n = 229	%			
T+	T+	13	15,8	66	28,8	0,02	0,47	0,24-0,90
Outras		69	84,2	163	71,2		2,15	1,11-4,15

T+T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T) e **Outras** = (C/T, C/C) + (C/C, C/C) + (T/T, C/C) + (C/C, T/C). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.7 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ E DE PORTADORES DE T+T-, PARA OS GENES *BLYS* E *CD40*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
BLYS	CD40	n = 47	%	n = 142	%			
T+	T+	13	27,6	66	46,5	0,03	0,44	0,21-0,90
T+	T-	34	72,4	76	53,5		2,27	1,11-4,66

T+T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (T/T, T/C) + (T/T, T/T) e **T+T-** = (C/T, C/C) + (T/T, C/C). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.8 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C/T - T+ E PORTADORES DE C/T - T-, PARA OS GENES *BLYS* E *CD40*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
BLYS	CD40	N = 35	%	N = 106	%			
C/T	T+	8	22,8	50	47,2	0,01	0,33	0,14-0,80
C/T	T-	27	77,2	56	52,8		3,01	1,25-7,24

C/T e T+ = (C/T, T/T) + (C/T, T/C) e **C/T e T-** = (C/T, C/C). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

5.4.2 Análises de interação entre os genes *BLYS* e *CD19*

Foram analisados 79 pacientes e 213 indivíduos-controle.

As frequências de todas as combinações possíveis entre os genótipos de *BLYS* e *CD19* são semelhantes entre pacientes e controles. Ou seja, nenhum dos 46 testes de associação destas combinações com o PFE revelaram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles.

5.4.3 Análises de interação entre os genes *CD40* e *CD19*

Foram analisados 79 pacientes e 219 indivíduos-controle. Todos os resultados mostrados seguem a seguinte ordem: o primeiro fator é referente ao SNP -1(C,T) de *CD40* e o segundo é referente ao -30(C,T) de *CD19*.

Dentre todas as 46 comparações realizadas, foram encontradas quatro que revelam diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e controles:

- I. Indivíduos C+T+ em relação a indivíduos C+T- (TABELA 5.9);
- II. Indivíduos C+T+ em relação a indivíduos portadores de todas as outras combinações (TABELA 5.10);
- III. Indivíduos T+C+ em relação a indivíduos T-C- (TABELA 5.11);
- IV. Indivíduos T-T+ em relação a indivíduos a indivíduos portadores de todas as outras combinações (TABELA 5.12);

Há uma tendência de aumento das frequências das combinações C+T+ (OR = 3,85 e 3,0) e T-T+ (OR = 2,07) e de diminuição de T+C+ (OR = 0,45) entre pacientes. Portanto, aparentemente as combinações C+T+ e T-T+ podem tornar os indivíduos que as possuem mais susceptíveis, enquanto os T+C+ são mais resistentes ao PFE. Percebe-se que o efeito de susceptibilidade é devido à presença de C em *CD40* (especialmente em homozigose, já que T- corresponde ao genótipo C/C) e T em *CD19*.

TABELA 5.9 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E PORTADORES DE C+T- PARA OS GENES *CD40* E *CD19*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
CD40	CD19	n = 75	%	n = 159	%			
C+	T+	72	96,0	137	86,1	0,02	3,85	1,12-13,31
C+	T-	3	4,0	22	13,9		0,26	0,08-0,90

C+T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) + (C/C, T/T) e **C+T-** = (C/T, C/C) + (C/C, C/C). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.10 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO C+T+ E PORTADORES DE TODAS AS OUTRAS COMBINAÇÕES POSSÍVEIS PARA OS GENES *CD40* E *CD19*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
CD40	CD19	n = 79	%	n = 177	%			
C+	T+	72	91,1	137	77,4	0,008	3,0	1,28-7,04
Outras		7	8,9	40	22,6		0,33	0,14-0,78

C+T+ = (C/T, C/T) + (C/T, T/T) + (C/C, T/C) + (C/C, T/T) e **Outras** = (C/C, C/C) + (T/T, T/C) + (T/C, C/C) + (T/T, T/T). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.11 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+C+ E PORTADORES DE T-C- PARA OS GENES *CD40* E *CD19*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
CD40	CD19	n = 45	%	n = 107	%			
T+	C+	13	28,9	51	47,7	0,04	0,45	0,21-0,94
T-	C-	32	71,1	56	52,3		2,24	1,06-4,74

T+ C+ = (C/T, C/T) + (T/T, C/T) + (C/T, C/C) e T- C- = (C/C, T/T). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

TABELA 5.12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DA COMBINAÇÃO T+T+ DE TODAS AS OUTRAS COMBINAÇÕES PARA OS GENES *CD40* E *CD19*, ENTRE PACIENTES E CONTROLES.

		Pacientes		Controles		<i>P</i>	OR	IC(95%)
CD40	CD19	n = 79	%	n = 216	%			
T-	T+	52	65,8	104	48,1	0,007	2,07	1,21-3,55
Outras		27	34,2	112	51,9		0,48	0,28-0,82

T- T+ = (C/C, T/T) + (C/C, T/C) e Outras = (T/C, T/C) + (C/C, C/C) + (T/T, T/C) + (T/C, T/T) + (T/C, C/C) + (T/T, T/T). *P*: probabilidade; OR: “odds ratio”; IC: intervalo de confiança.

5.4.4 Análises de interação entre o gene *IL4* e os genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*

Foram analisados 91 pacientes e 119 indivíduos-controle para *IL4* e *BLYS*; 89 e 115 para *IL4* e *CD40*; e 86 e 100 para *IL4* e *CD19*.

Todas as diferenças estatisticamente significantes encontradas são explicáveis pelas associações anteriormente encontradas para o polimorfismo -590 de *IL4*, para o qual foram encontradas associações positivas com o genótipo T/T (OR = 2,71) e associação negativa com a variante C (OR = 0,13) (PEREIRA *et al.* 2004).

5.4.5 Análises de interação entre o gene *IL6* e os genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*

Foram analisados 91 pacientes e 121 indivíduos-controle para *IL6* e *BLYS*; 89 e 115 para *IL6* e *CD40*; e 91 e 121 para *IL6* e *CD19*.

Associações com variantes de *IL6*-174 demonstram que o genótipo C/C tem um efeito protetor (OR = 0,13) enquanto portadores do alelo G são mais susceptíveis (OR = 7,66) (PEREIRA *et al.* 2004).

Nas análises combinadas de *IL6* com os genes estudados neste trabalho não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para qualquer das comparações entre pacientes e controles.

5.4.6 Análises de Interação entre o Gene *HLA-DRB1* e os Genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*

Foram analisados 63 pacientes e 223 indivíduos-controle para *HLA-DRB1* e *BLYS*; 61 e 218 para *HLA-DRB1* e *CD40*; e 59 e 203 para *HLA-DRB1* e *CD19*.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para qualquer das comparações entre pacientes e controles.

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Freqüentemente são registradas associações entre polimorfismos e determinada doença complexa, que não são confirmadas em outros estudos (WILLETT *et al.*, 2002). Alguns dos fatores que contribuem para este fenômeno, estão relacionados à amostragem populacional – amostra pequena, uso de grupos controles inapropriados e falha ao coletar os dados a respeito dos fatores ambientais que podem modificar a relação entre genótipo e doença. Cientes destes fatores, tentou-se reduzi-los o quanto possível. Outro fator, não menos importante, é a tendenciosidade a publicar apenas resultados positivos.

Com relação à composição étnica, a amostra foi dividida em dois subgrupos populacionais: indivíduos de origem predominantemente européia e indivíduos de origem mestiça predominantemente africana + européia. Estudos de associação genética podem levar a associações espúrias se houver diferenças entre as frequências alélicas entre os subgrupos populacionais ou se esses estratos populacionais estiverem representados desigualmente entre pacientes e controles.

As diferenças nas frequências alélicas entre grupos étnicos podem influenciar ou alterar os resultados e conclusões de estudos de associação, pois: (i) a frequência do alelo associado num grupo pode estar numa frequência muito baixa ou mesmo ausente em outros grupos étnicos; (ii) a associação com a mesma variante pode estar presente em vários grupos, mas a contribuição relativa e impacto pode variar, ou seja, o risco relativo conferido pelo alelo difere entre os grupos (PETZL-ERLER, 1999). Para evitar-se conclusões errôneas, todas as comparações foram realizadas considerando-se os dois subgrupos populacionais que compõem a amostra separadamente.

6.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO INDIVIDUAL DOS GENES *CD40*, *BLYS* E *CD19* COM O PFE

Os resultados não revelaram qualquer associação de variantes alélicas e genotípicas *CD40* -1(C,T), *BLYS* -871(C,T) e *CD19* -30(C,T) com o PFE. A ausência de associação leva-nos a sugerir que estes SNP, quando considerados individualmente, não influenciam a susceptibilidade ou resistência ao PFE em nossa população. Entretanto, os resultados não excluem a participação dessas moléculas na patogênese da doença, mas indicam que sua variabilidade não tem impacto sobre o risco de desenvolvimento do PFE na população brasileira.

Existem outros polimorfismos nestes genes, além dos analisados neste trabalho, que ainda precisam ser estudados, uma vez que podem ter efeito sobre a susceptibilidade ao PFE. Dentre estes, estão os demais polimorfismos já identificados para estes genes: um SNP em *CD40*, quatro em *BLYS* e oito SNP e uma repetição dinucleotídica em *CD19* (vide tópico 2.4 em Revisão Bibliográfica). Além destes, é provável que existam outros polimorfismos ainda não identificados, já que poucos estudos em busca de variabilidade alélica para estes genes foram realizados, e as populações analisadas até o momento são apenas a europeia (*CD40*) e a japonesa (*BLYS* e *CD19*) (TOMER *et al*, 2002; KAWASAKI *et al*, 2002; KUROKI *et al*, 2002). Populações brasileiras são muito diversas, descendendo de imigrantes vindos da Europa, África e Ásia, e dos habitantes iniciais do continente, os ameríndios. Portanto, seria interessante que fossem realizadas triagens em busca de variabilidade alélica dos genes *CD40*, *BLYS* e *CD19* em nossa população e, uma vez caracterizada, que essa fosse analisada para associação com o PFE. Se adequadamente explorada, a heterogeneidade genética de populações brasileiras poderá adicionar informações valiosas para o entendimento das causas das doenças complexas (PETZL-ERLER, 1999).

Ainda, seria interessante investigar se as variantes desses genes estão associadas em diferentes subgrupos de pacientes: aqueles que manifestam a forma localizada e aqueles com a forma generalizada, por exemplo. Ou ainda, verificar se

estão associadas à idade de manifestação da doença, resposta diferencial ao tratamento, nível de auto-anticorpos séricos, etc. As variantes podem estar influenciando formas específicas da doença ou, ainda, terem um efeito sobre o curso clínico da doença ao invés de simplesmente aumentar ou diminuir a susceptibilidade ao PFE.

Com relação a associações já descritas para *CD40* com outras doenças auto-imunes, TOMER *et al.*, (2002) encontraram associação positiva do genótipo C/C ($P = 0,048$ e $OR = 1,6$) e doença de Graves em uma população européia caucasiana. O teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) mostrou transmissão preferencial do alelo C ($P = 0,02$). A associação tornou-se mais forte quando foram analisados apenas os probandos de famílias utilizadas nos testes de ligação da região 20q11 (na qual se localiza o gene *CD40*) com a doença de Graves ($P = 0,009$, $OR = 4,8$). Notem-se os valores de P neste estudo, próximos ao limiar de significância. Também esses autores optaram por não corrigir os valores de P .

Com relação aos efeitos funcionais, é possível que o SNP -1(C,T) em *CD40* altere os níveis de tradução de CD40. Este SNP está localizado dentro de uma sequência que é importante na regulação da taxa de tradução. O códon AUG de início da tradução não é, por si só, suficiente para o reconhecimento do sítio de início de tradução pelo ribossomo, ele é reconhecido eficientemente somente quando está no contexto correto. Este consiste da sequência consenso $-6GCC^A/GCCAUGG+4$, conhecida como sequência Kozak. Mudanças dessa sequência afetam a fidelidade e a eficiência do início da tradução (KOZAK, 1991). Como pode ser notado, a mudança C para T nesta posição não é conservadora e pode estar envolvida em alterações dos níveis de tradução de CD40. Os resultados das análises de associação e ligação, juntamente com a possibilidade de envolvimento na modulação da taxa de tradução protéica, levaram TOMER *et al.* (2002) a sugerirem que o gene *CD40* pode predispor à doença de Graves de várias maneiras, todas através do aumento da expressão de CD40 sobre as células apresentadoras de antígenos. Os mecanismos pelos quais certos genótipos de *CD40* poderiam estar induzindo auto-imunidade ainda precisam ser elucidados. Os mesmos pesquisadores ressaltam ainda que, devido ao baixo risco

relativo conferido pelo genótipo C/C, não está claro se a associação com o alelo C é causal ou se este está em desequilíbrio de ligação com um alelo de outro gene. Somente estudos funcionais poderiam demonstrar qual dos polimorfismos seria o de susceptibilidade à doença.

Foi verificado que queratinócitos de pacientes com psoríase, uma doença inflamatória da pele mediada por células T, têm uma expressão aumentada de CD40 na superfície (DENFELD *et al.*, 1996). Dessa forma, células T inflamatórias ativadas expressando CD40L podem interagir com queratinócitos que expressam CD40. Sendo assim, essa interação pode estar envolvida na patogênese da doença. Se isso é modulado por variantes genéticas não é sabido.

De qualquer forma, consideramos que ainda não está claro se a variabilidade genética de *CD40* está relacionada à variação de susceptibilidade a doenças auto-imunes. O resultado do presente estudo, e a fraca associação com doença de Graves, relatada acima, não são condizentes com um papel importante dos alelos de *CD40* na diversificação das respostas auto-imunes.

Com relação ao gene *BLYS*, foram feitos estudos de associação das variantes da posição -871 com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide (AR) numa população japonesa. Não foram encontradas associações com essas doenças. Entretanto, houve uma tendência de aumento da frequência do genótipo -871 T/T em um subconjunto de pacientes com lúpus que possuem anticorpos anti-Sm ($P = 0,08$). Observou-se, ainda, que o nível de RNAm de *BLYS* em monócitos de indivíduos saudáveis que possuem o alelo T foi significativamente mais elevado quando comparado com indivíduos sem o alelo T ($P = 0,010$) (KAWASAKI *et al.*, 2002).

A posição -871 de *BLYS* está localizada em um sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1, que é preferencialmente expresso em células mielóides em diferenciação (HROMAS *et al.*, 1991). Portanto, é possível que as variantes de *BLYS* possam diferir quanto à afinidade de ligação do fator MZF1. Entretanto, ainda não está confirmado experimentalmente se MZF1 é realmente o fator de transcrição que se liga a esta região, nem se este polimorfismo causa mudanças na atividade do promotor (KAWASAKI *et al.*, 2002).

Outros pesquisadores encontraram níveis significativamente mais elevados de BLYS no soro de pacientes com LES, artrite reumatóide (AR) e síndrome de Sjögren quando comparados com indivíduos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2001; GROOM *et al.*, 2002; CHEEMA *et al.*, 2001). Foi sugerido que sinais de sobrevivência mediados por BLYS possam comprometer a capacidade de células B autorreativas de responder a sinais apoptóticos; portanto, a produção anormal de BLYS pode ser um evento crucial no desencadeamento da auto-imunidade (GROOM *et al.*, 2002). Se estes níveis alterados têm algum elo causal com polimorfismos genéticos ainda não é sabido.

Os resultados do presente estudo, assim como os de KAWASAKI *et al.* (2002) citados acima, levam-nos a concluir que, ao menos no que concerne a modulação da susceptibilidade individual a doenças auto-imunes, o papel desempenhado pela variabilidade genética de BLYS é secundário.

O SNP -30(C,T) de *CD19* está localizado no íntron 17 e desconhece-se qualquer efeito funcional dessa variabilidade. Neste trabalho, este SNP foi analisado considerando-se um possível desequilíbrio de ligação com outro SNP que pudesse ter algum efeito funcional sobre o PFE, sem contudo descartar-se *a priori* um possível efeito direto desta variabilidade sobre a susceptibilidade à doença. Um estudo de associação deste SNP com LES, AR e doença de Crohn numa população japonesa, mostrou, para LES, associação negativa com o alelo -30T ($P = 0,028$) e associação positiva com repetições GT na região 3' não-traduzida maiores ou iguais a 15, em dois grupos independentes de pacientes ($P = 0,011$ e $P = 0,035$). Note-se aqui também, os valores de P , próximos ao limiar de significância e sem correção. Não foram encontradas associações para AR e doença de Crohn (KUROIKI *et al.*, 2002). Os mesmos pesquisadores mostraram que -30(C,T) está em desequilíbrio de ligação com esta repetição dinucleotídica. O nível de RNAm de CD19 em células B foi mais baixo em indivíduos possuindo alelos GT₍₁₅₋₁₈₎ comparados com aqueles com alelos de repetição menor; entretanto, a diferença não é estatisticamente significativa. Os pesquisadores sugerem que a discreta redução do nível de RNAm seja devida ao alongamento da repetição GT, ou a um alelo em outro loco em desequilíbrio de ligação com *CD19* -30. Especula-se, ainda, que uma redução na expressão de CD19 possa

levar a defeitos na indução da tolerância a auto-antígenos provavelmente por causa da diminuição da sinalização via BCR em células B imaturas, resultando na persistência de células B autorreativas (TEDDER *et al.*, 1997).

Ainda que as variantes genéticas de *CD19* possam ter alguma relevância funcional, concluímos que, ao menos para o PFE e algumas outras doenças auto-imunes, o SNP -30(C,T) e outros sítios variáveis (SNP, microssatélite), que se encontram em forte desequilíbrio de ligação com esse, não exercem, de forma individual, um efeito suficientemente pronunciado para alterar de forma significativa a susceptibilidade e/ou resistência à doença.

6.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *BLYS* 313(G,A)

O SNP 313(G,A) do exon 1 foi genotipado apenas em um subconjunto de indivíduos saudáveis da amostra de origem predominantemente européia. Devido à baixa frequência do alelo A (0,4%), esse SNP não foi utilizado para análise de associação com o PFE.

Com isto, não se descarta uma possível implicação desse SNP na modulação da susceptibilidade ao PFE. Entretanto, seria necessária uma amostra de tamanho maior para que o efeito de uma variante rara pudesse ser detectado.

Até o presente, este SNP foi analisado apenas em uma população japonesa, na qual a frequência do alelo 313A também é baixa (1,8% em pacientes com LES e 0,6% em pacientes com AR), não tendo sido encontrada na amostra controle. Como frequências alélicas diferem entre populações, decidiu-se verificar sua frequência em nossa população (brasileira, mestiça).

Bastante interessante é o fato de que o único indivíduo heterozigoto encontrado tem ancestralidade indígena. A partir desta observação, decidiu-se tipar alguns indivíduos pertencentes às populações indígenas do estado do Paraná: 59 Guarani da área de reserva indígena Rio das Cobras, 60 Kaingang de Ivaí, e 60 Kaingang de Rio das Cobras. A frequência do SNP 313A nestas populações é de 14,4%, 12,5% e 16,7%, respectivamente.

Pretende-se aumentar a amostra populacional futuramente, em um estudo de genética de populações, que não constitui um dos objetivos desta dissertação.

6.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE INTERAÇÃO ENTRE OS GENES *CD40*, *BLYS* E *CD19* NA MODULAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AO PFE

Com relação às análises de interação gênica, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para certos genótipos compostos dos SNPs *BLYS* - 871(C,T) e *CD40* -1(C,T) e de *CD40* -1(C,T) e *CD19* -30(C,T). Essas associações estariam revelando que os indivíduos portadores de T em *CD40* -1 são mais resistentes quando combinados com heterozigotos em *BLYS*; indivíduos portadores de C em *CD40* -1 e T em *CD19* -30 são mais suscetíveis e indivíduos portadores de T em *CD40* -1 e C em *CD19* -30 são mais resistentes (TABELA 6.1). Note-se a constância do efeito protetor de T em *CD40* -1, quando combinado com certos genótipos de *BLYS* ou de *CD19*. Na análise individual, também foi observada uma tendência de diminuição de -1T em pacientes ($P = 0,08$). Com relação ao gene *CD19*, a análise individual também revelou uma tendência de aumento da frequência de portadores de -30T nos pacientes ($P = 0,07$).

TABELA 6.1 – RESUMO DOS EFEITOS FENOTÍPICOS DAS COMBINAÇÕES DOS GENES *CD40*, *BLYS* E *CD19* SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE AO PFE.

<i>CD40</i> -1	<i>BLYS</i> -871	<i>CD19</i> -30		
T+	T/C		OR = 0,33	> resistência
C+		T+	OR = 3,0 e 3,85	> susceptibilidade
T+		C+	OR = 0,45	> resistência

Estes resultados devem ser interpretados com cautela. Como mencionado anteriormente, não foram aplicadas correções aos valores de *P*. Essas correções, que visam minimizar o erro estatístico do tipo I em estudos com múltiplas comparações

independentes entre as amostras de pacientes e controles, resultariam em valores de $P > 0,05$, ou seja, a significância estatística desapareceria. Somando-se o número de comparações independentes entre as amostras de pacientes e controles, considerando-se os genótipos compostos de *CD40*-1(C,T), *BLYS* -871(C,T) e *CD19* -30(C,T), chega-se ao número de setenta e cinco (75) comparações. Destas, são esperadas 5% com $P \leq 0,05$, ou seja, 3,75. Entretanto, em nove comparações (12%), obtiveram-se resultados estatisticamente significativos; o que pode ser um indicativo de que ao menos alguns desses valores estejam revelando associações verdadeiras. Sendo assim, os desvios observados podem estar revelando tendências, que merecem ser melhor exploradas em uma amostra de tamanho maior e em outros grupos étnicos, para que se possa confirmar ou rejeitar essas associações.

Não está claro qual seria o possível efeito funcional da combinação de genótipos de *CD40* e *BLYS* sobre a susceptibilidade ao PFE. Os SNP estudados em ambos os genes situam-se em sítios que podem modular o nível de tradução ou transcrição dessas moléculas. Além disso, foi encontrada associação positiva do genótipo C/C em *CD40* com a doença de Graves e observada uma tendência de aumento do genótipo -871 T/T de *BLYS* em um subconjunto de pacientes com LES. Estas observações levaram os pesquisadores a sugerir que as variantes C em *CD40* -1 e T em *BLYS* -871 podem aumentar a concentração dessas moléculas sobre as células apresentadoras de antígenos e que, de alguma forma ainda não esclarecida, podem levar à auto-imunidade (TOMER *et al.*, 2002; KAWASAKI *et al.*, 2002). Nossos resultados apontam para a mesma direção dos encontrados nesses estudos de outras doenças auto-imunes. Contudo, a possível influência de *CD40* e *BLYS* sobre a patogênese do PFE só é perceptível para genótipos compostos de *CD40* e *BLYS*. Aparentemente, o efeito protetor de T em *CD40* -1 se manifesta especialmente na presença do genótipo C/T em *BLYS*. Portanto, é possível que essas moléculas interajam na modulação da susceptibilidade ao PFE.

A justificativa para um possível efeito da combinação de genótipos de *CD40* e *CD19* sobre a susceptibilidade ao PFE, também não está clara. Foi encontrada associação negativa de -30T com LES e também foi verificada uma discreta redução

do nível de RNAm de CD19 em células B de indivíduos com LES, possuindo alelos GT₍₁₅₋₁₈₎ na região 3'UTR. Esse efeito pode ser devido ao alongamento da repetição GT que está em desequilíbrio de ligação com *CD19* -30T, ou a um alelo em outro loco também em desequilíbrio com *CD19* -30T (KUROKI *et al.*, 2002). Especula-se que uma redução na expressão de CD19 possa levar a defeitos na indução da tolerância a auto-antígenos provavelmente por causa da diminuição da sinalização via BCR em células B imaturas, resultando na persistência de células B autorreativas (TEDDER *et al.*, 1997). Portanto, é possível que haja um pequeno aumento na expressão de CD40 devido a -1T e uma ligeira redução na expressão de CD19 devido a -30T e que a combinação dessas variantes genéticas altere os limiares de sinalização intracelular que regulam a ativação ou não de células B autorreativas, influenciando assim a susceptibilidade ao PFE.

De acordo com o modelo multifatorial de susceptibilidade genética a doenças de etiologia complexa, a contribuição genética para o risco de desenvolvimento dessas doenças resulta de um grande número de variantes polimórficas, que exercem um pequeno efeito fenotípico (WILLET, 2002). WILLIAMS *et al.*, (2000), ao estudarem genes individualmente não encontraram evidências de associação com a hipertensão. Entretanto, associações foram encontradas quando interações gênicas foram consideradas. Os resultados encontrados neste trabalho com relação à susceptibilidade ao PFE estão de acordo com este modelo. Note-se, entretanto, que ao se fazerem as análises de interação gênica, o número de classes é elevado e os tamanhos dos estratos comparados bastante reduzidos, de forma que muitas das comparações estatísticas não puderam ser realizadas. Amostras numerosas de pacientes e controles permitiriam concluir com maior segurança a respeito da existência ou inexistência de interações entre esses genes. Sugerimos que essas análises sejam refeitas em um trabalho futuro, após ampliação do tamanho das sub-amostras populacionais.

6.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DE INTERAÇÃO ENTRE OS GENES *IL4*, *IL6* E *HLA-DRB1* E OS GENES *BLYS*, *CD40* E *CD19*

Não foram identificadas interações entre os genes *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1* e os genes *BLYS*, *CD40* e *CD19* que pudessem estar influenciando a patogênese do PFE. Todos os desvios estatisticamente significativos puderam ser explicados pelas associações anteriormente descritas para *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1* (PEREIRA *et al.*, 2004; PAVONI *et al.*, 2003).

Devido ao tamanho reduzido de vários estratos, muitas das comparações estatísticas não puderam ser realizadas. Sugerimos que essas análises também sejam refeitas, após ampliação do tamanho das sub-amostras populacionais, para que se possa concluir com maior segurança a respeito da existência ou não de interações entre esses genes.

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de associação de variantes de *CD40*, *BLYS* e *CD19* individualmente com o PFE e também com outras doenças auto-imunes, e a constatação de associação para com outras doenças, pode acontecer porque: (i) o conjunto de genes que contribui para o estabelecimento de diversas patologias não é o mesmo e estes genes são importantes em algumas doenças mas não em outras; (ii) os verdadeiros genes envolvidos no desenvolvimento dessas doenças estão ligados aos genes *CD40*, *BLYS* ou *CD19* e, nas diversas populações, há diferentes graus de desequilíbrio de ligação (podendo ocorrer equilíbrio em algumas delas) entre variantes desses genes primariamente associados e os genes *CD40*, *BLYS* e *CD19*; (iii) os genes *CD40*, *BLYS* e *CD19* interagem de forma particular e complexa com outros genes do indivíduo, e uma análise genotípica mais completa permitiria desvendar estas interações.

Este estudo é o primeiro que caracteriza as frequências de variantes dos genes *CD40* -1(C,T), *BLYS* -871(C,T) e *CD19* -30(C,T) em uma população brasileira. A frequência encontrada para *CD40* -1T para a população brasileira de origem predominantemente européia (24%) é muito semelhante à encontrada para uma população mestiça, também de origem predominantemente européia, composta de indivíduos norte-americanos, italianos, ingleses e israelenses (25%) (TOMER *et al.*, 2002). Estas frequências diferem das encontradas para a população brasileira de origem predominantemente africana (14,9%) ($\chi^2 = 6,7$, GL = 1). A frequência da variante -871T de *BLYS*, em uma população oriental (44,3%) (KAWASAKI *et al.*, 2002), não difere da observada para o estrato de origem predominantemente européia da população brasileira (38,5%) ($\chi^2 = 0,75$, GL = 1), mas difere da obtida para o estrato de origem predominantemente africana da população brasileira (26%) ($\chi^2 = 4,37$, GL = 1). Já as frequências alélicas encontradas para *CD19* -30C, tanto para o estrato de origem predominantemente européia, quanto para o de origem predominantemente africana (30,0% e 21,5%, respectivamente), não diferem da frequência alélica encontrada por KUROKI *et al.* (2002), para uma população oriental (25%) ($\chi^2 = 2,47$ e 0,87, respectivamente, GL = 1).

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram analisadas variantes dos genes *CD40* -1, *BLYS* -871 e *CD19* -30 em 147 pacientes com pênfigo foliáceo endêmico e 290 indivíduos-controle.

Não foram encontradas associações de variantes alélicas ou genotípicas desses genes individualmente com o PFE.

Não foram identificadas interações entre os genes *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1* e os genes *BLYS*, *CD40* e *CD19*, uma vez que todos os desvios estatisticamente significativos puderam ser explicados pelas associações anteriormente descritas para *IL4*, *IL6* e *HLA-DRB1*.

Associações negativas foram encontradas ao analisarem-se os genótipos compostos de *BLYS* -871 e *CD40* -1: C+T+ (OR = 0,52 e 0,56), T+T+ (OR = 0,47 e 0,44) e C/T e T+ (OR = 0,33). Ao analisarem-se os genótipos compostos de *CD40* -1 e *CD19* -30, foram observadas associações positivas com C+T+ (OR = 3,85 e 3,0) e T-T+ (OR = 2,07) e negativa com T+C+ (OR = 0,45).

Os resultados desse estudo levam-nos a concluir que a variabilidade analisada não influencia, de forma expressiva, o desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico.

Sugere-se que o possível efeito dos genótipos compostos de *CD40* e *BLYS*, como os de *CD40* e *CD19*, sobre a susceptibilidade/resistência ao PFE sejam investigadas de forma mais detalhada em estudos posteriores, utilizando-se amostras maiores de pacientes e controles.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed., Porto Alegre:Artes Médicas, 1997.
- AMAGAI M. Keratinocyte-keratinocyte interactions, cadherins and pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**; 104:146-152, 1995a.
- AMAGAI M, HASHIMOTO T, GREEN KJ, SHIMIZU N, NISHIKAWA T. Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. **Journal of Investigative Dermatology**; 104: 895-901, 1995b.
- ARMITAGE RJ, MACDUFF BM, SPRIGGS MK, FANSLOW WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. **The Journal of Immunology**; 150(9):3671-80, 1993.
- BECKER KG, SIMON RM, BAILEY-WILSON JE *et al.* Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 95: 9979-9984, 1998.
- CAMPBELL I, REIS V, AOKI V *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Annal Dermatology**; 76(1):13-33, 2001.
- CARTER RH, FEARON DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. **Science**; 256:105-107, 1992.
- CASTLE BE, KISHIMOTO K, STEARNS C, BROWN ML, KEHRY MR. Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. **The Journal of Immunology**; 151(4):1777-88, 1993.
- CERNA M, FERNANDEZ-VINA M, FRIEDMAN H, MORAES JR, MORAES ME, DIAZ L, STASTNY P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**; 42:138-140, 1993.
- CHEEMA GS, ROSCHKE V, HILBERT DM, STOHL W. Elevated serum B lymphocyte stimulator level in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Arthritis and Rheumatism**; 44:1313-1319, 2001.
- CHIDGEY MAJ. Desmosomes and disease. **Histology and Histopathology**; 12:1159-1168, 1997.
- CLARK EA, LEDBETTER JA. How B and T cells talk to each other. **Nature**; 367:425-428, 1994.
- CONNE B, STUTZ A, VASSALLI JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? **Nature Medicine**; 6(6):637-41, 2000.

- DATTA SK, KALLED SL. CD40-CD40 ligand interaction in autoimmune disease. **Arthritis and Rheumatism**; 40(10):1735-451, 1997.
- DE MESSIAS IT, SANTAMARIA J, RAGIOTTO R, DOI EM, KAJDACSY-BALLA. A. Complement activation in Brazilian pemphigus foliaceus. **Clinics and Experimental Dermatology**; 14(1):51-5, 1989.
- DENFELD RW, HOLLENBAUGH D, FEHRENBACH A, WEISS JM, VON LEOPRECHTING A, MAI B, VOITH U, SCHOPF E, ARUFFO A, SIMON JC. CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. **European of Journal Immunology**; 26(10):2329-34, 1996.
- DESAI-MEHTA A, LU L, RAMSEY-GOLDMAN R, DATTA SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. **The Journal of Clinical Investigation**; 97(9):2063-73, 1996.
- DIAZ LA, SAMPAIO SAP, RIVITTI EA, MARTINS CR, CUNHA PR, LOMBARDI C, ALMEIDA FA, CASTRO RM, MACCA ML, LAVRADO C, HANS-FILHO G, BORGES P, CHAUL A, MINELLI L, EMPINOTTI JC, FRIEDMAN H, CAMPBELL I, LABIB RS, ANHALT GJ. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **Journal of Investigative Dermatology**; 92: 4-12, 1989.
- DO RKG, HATADA E, LEE H, TOURIGNY MR, HILBERT D, CHEN-KIANG S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of human immune responses. **The Journal of Experimental Medicine**; 192:953-964, 2000.
- DURIE FH, FAVA RA, FOY TM, ARUFFO A, LEDBETTER JA, NOELLE RJ. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. **Science**; 261(5126):1328-30, 1993.
- DURIE FH, FOY TM, MASTERS SR, LAMAN JD, NOELLE RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. **Immunology Today**; 15(9):406-11, 1994.
- FOY TM, PAGE DM, WALDSCHMIDT TJ, SCHONEVELD A, LAMAN JD, MASTERS SR, TYGRETT L, LEDBETTER JA, ARUFFO A, CLAASSEN E, *et al.* An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. **The Journal of Experimental Medicine**; 182(5):1377-88, 1995.
- GARIN-BASTUJI S, SOUISSI R, BLUM L *et al.* Comparative Epidemiology of Pemphigus in Tunisia and France: Unusual Incidence of Pemphigus Foliaceus in Young Tunisian Women. **Journal of Investigative Dermatololy**; 104:302-305, 1995.
- GERRITSE K, LAMAN JD, NOELLE RJ, ARUFFO A, LEDBETTER JA, BOERSMA WJ, CLAASSEN E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 93(6):2499-504, 1996.

- GREWAL IS, FLAVELL RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. **Immunological Reviews**;153:85-106, 1996.
- GROOM J, KALLED SL, CUTLER AH, OLSON C, WOODCOCK SA, SCHNEIDER P, TSCHOPP J, CACHERO TG, BATTEN M, WHEWAY J, MAURI D, CAVILL D, GORDON TP, MACKAY CR, MACKAY F. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**; 109:59-68, 2002.
- GROSS JA, DILLON SR, MUDRI S, JOHNSTON J, LITTAU A, ROQUE R, RIXON M, SCHOU O, FOLEY KP, HAUGEN H, MCMILLEN S, WAGGIE K, SCHRECKHISE RW, SHOEMAKER K, VU T, MOORE M, GROSSMAN A, CLEGG CH. Taci-Ig neutralizes molecules critical for a B cell development and autoimmune disease impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. **Immunity**; 15:289-302, 2001.
- GROSS JA, JOHNSTON J, MUDRI S, ENSELMAN R, DILLON SR, MADDEN K, XU W, PARRISH-NOVAK J, FOSTER D, LOFTON-DAY C, MOORE M, LITTAU A, GROSSMAN A, HAUGEN H, FOLEY K, BLUMBERG H, HARRISON K, KINDSVOGEL W, CLEGG CH. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. **Nature**; 404:995-999, 2000.
- GRZYBOWSKA EA, WILCZYNSKA A, SIEDLECKI JA. Regulatory functions of 3'UTRs. **Biochemistry and Biophysical Resource Community**; 288(2):291-5,2001.
- GUO S, THOMPSON E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**; 48:361-372, 1992.
- HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI E, EATON DP, LIN MS, DIAZ L. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) - 1998. **Clinics in Dermatology**; 17:225-235,1999.
- HROMAS R, COLLINS SJ, HICKSTEIN D, RASKIND W, DEAVEN LL, O'HARA P, HAGEN FS, KAUSHANSKY K. A retinoic acid responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. **The Journal of Biological Chemistry**; 266:14183-14187, 1991.
- JANEWAY CA, TRAVERS P. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 2 ed., porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- JORDON RE. Complement activation in pemphigus. *Journal of Investigative Dermatology*. 74: 357-359, 1980 (In: HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI E, EATON DP, LIN MS, DIAZ. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) - 1998. **Clinics in Dermatology**; 17: 225-235, 1999.
- KAWASAKI A, TSUCHIYA N, FUKAZAWA T, HASHIMOTO H, TOKUNAGA K. Analysis of the association of human BLyS (BAFF, TNFS13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**; 3:424-429, 2002.

- KAYAGAKI N, YAN M, SESHASAYEE D, WANG H, LEE W, FRENCH D, GREWAL IS, COCHRAN AG, GORDON NC, YIN JP, STAROVASNIK MA, DIXIT VM. BAFF/BLyS receptor 3 binds the cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF- κ B2. **Immunity**; 10:515-524, 2002.
- KOZAK M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. **Journal of Biological Chemistry**; 266(30):19867-70, 1991.
- KUBY J. **Immunology**. 4 ed. New York: WH Freeman and Company, 2002.
- KUROKI K, TSUCHIYA N, TSAO BP, GROSSMAN JM, FUKAZAWA T, HAGIWARA K, KANO H, TAKAZOE M, IWATA T, HASHIMOTO H, TOKUNAGA K. Polymorphisms of human CD19 gene: possible association with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. **Genes and Immunity**; 3: 21-30, 2002.
- KURTZKE JF, Epidemiology of MS (In: STEINMAN L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. **Cell**; 85:299-302, 1996).
- LAHIRI DK, NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for FRLP studies. **Nucleic Acids Research**; 19:5444, 1991.
- LI N, AOKI V, HANS-FILHO G, RIVITTI, DIAZ LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**; 197:1501-1510, 2003.
- LIN MS, FU CL, AOKI V, HANS-FILHO G, RIVITTI EA, MORAES JR, MORAES ME, LAZARO AM, GIUDICE GJ, STASTNY P, DIAZ LA. Characterization of desmoglein-1 epitopes recognized by T cells from patients with fogo selvagem. **Journal of Investigative Dermatology**; 105:207-213, 2000.
- LIOSSIS SN, KOVACS B, DENNIS G, KAMMER GM, TSOKOS GC. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. **The Journal of Clinical Investigation**; 98(11):2549-57, 1996.
- LOISEAU P, LECLEACH L, PROST C, LEPAGE V, BUSSON M, BASTUJI-GARIN S, ROUJEAU JD, CHARRON D. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Journal of Autoimmunity**; 15:67-73. 2000.
- LOMBARDI C, BOGES PC, CHAUL A, SAMPAIO SAP, RIVITTI HF, MARTINS CR, SANCHES JÁ, CUNHA PR, HOFFMANN RG DIAZ LA. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**; 98:847-850, 1992.
- MAHONEY MG, WANG ZH, STANLEY JR. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. **Journal of Investigative Dermatology**; 113:22-25, 1999.

- MALHEIROS D. **Pênfigo foliáceo endêmico e polimorfismo genético da desmogleína 1: existe alguma relação?** Curitiba, 2003. Monografia de conclusão de curso. Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MARTEL M, JOLY P. Pemphigus: autoimmune diseases of keratinocyte's adhesion molecules. **Clinics in Dermatology**; 19: 662-674, 2001a.
- MARTEL P, GILBERT D, BUSSON M *et al.* Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**; 3:205-210. 2002.
- MARTEL P, GILBERT D, DROUOT L, PROST C, RAUX G, DELAPORTE E, JOLY P, TRON F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes and Immunity**; 2:41-43, 2001b.
- MILLER MP. **RxC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer.** Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.
- MIYAGAWA S, AMAGAI M, NIIZEKI H, YAMASHINA Y, KANESHIGE T, NISHIKAWA T, SHIRAI T, INOKO H. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. **Tissue Antigens**; 54: 333-340, 1999.
- MOORE PA, BELVEDERE O, ORR A, PIERI K, LAFLEUR DW, FENG P, SOPPET D, CHARTERS M, GENTZ R, PARMELEE D, LI Y, GALPERINA O, GIRI J, ROSCHKE V, NARDELLI B, CARRELL J, SOSNOVTSEVA S, GREENFIELD W, RUBEN SM, OLSEN HS, FIKES J, HILBERT DM. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. **Science**; 285:260-263, 1999.
- MORAES JR, MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**; 33:388-391, 1991.
- MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M, LAZARO A, DIAZ A, FILHO GH, FRIEDMAN H, RIVITTI E, AOKI V, STASTNY P, MORAES JR. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**; 49:35-40, 1997.
- NGUYEN VT *et al.* The pathophysiological significance of non-desmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Pemphigus vulgaris and foliaceus patients develop antibodies against keratinocyte cholinergic receptors. **Archives in Dermatology**; 134:971-980, 1998.
- NOELLE RJ, ROY M, SHEPHERD DM *et al.* A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 89:6550-6554, 1992.

- O'CONNOR BP, RAMAN VS, ERIKSON LD, COOK WJ, WEAVER LK, AHONEN C. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. **Journal of Experimental Medicine**; 199(12): 5993-5996, 2004.
- PAVONI DP, ROXO VMMS, FILHO AM, PETZL-ERLER ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**; 4: 110-116, 2003.
- PEREIRA NF, HANSEN AJ, LIN MT, ROXO VMMS, BRAUN K, PETZEL-ERLER M. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for *IL6* variants. **Cytokine**; 28: 233-241, 2003.
- PETZL-ERLER ML, SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**; 33:408-414, 1989.
- PETZL-ERLER ML. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**; 51:199-211, 1999.
- PROBST CM. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1**. Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 1998.
- REBBECK T, SPITZ M, WU X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. **Nature Reviews Genetics**; 5: 589-597, 2004.
- RICKERT RC, RAJEWSKY K, ROES J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. **Nature**; 376:352, 1995.
- RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**; 273:1516-1517, 1996.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2^a ed., Cold spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 1989.
- SATO S, ONO N, STEEBER DA, PISETSKY DS, TEDDER TF. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for development of B-1 lineage cell and autoimmunity. **Journal of Immunology**; 157:4371, 1996.
- SCHNEIDER RF, ROESSLI D, EXCOFIER L. **ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis, version 2000**. Genetics and Biometry Laboratories, Dept of Anthropology, University of Genève, Genève, 2000.
- SCHNEIDER, P.; MACKAY, F.; STEINER, V.; HOFMANN, K.; BODMER, J. L.; HOLLER, N.; AMBROSE, C.; LAWTON, P.; BIXLER, S.; ACHA-ORBEA, H.; VALMORI, D.; ROMERO, P.; WERNER-FAVRE, C.; ZUBLER, R. H.; BROWNING,

- J. L.; TSCHOPP, J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. **The Journal of Experimental Medicine** 189:1747-1756, 1999.
- SESHASAYEE D, VALDEZ P, YAN M, DIXIT VM, TUMAS D, GREWAL IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. **Immunity**; 18:279-288, 2003.
- SEYAMA K, NONOYAMA S, GANGSAAS I, HOLLENBAUGH D, PABST HF, ARUFFO A, OCHS HD. Mutations of the CD40 ligand gene and its effects on CD40 ligand Expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. **Blood**; 1998; 92:2421-2434.
- STAMENKOVIC I, CLARK EA, SEED B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. **EMBO Journal**; 8(5):1403-10, 1989.
- STRACHAN T, READ AP. **Genética Molecular Humana**. 2 ed. São Paulo: Artmed Editora,. 2002.
- SVEJGAARD A, RYDER LP. HLA and diseases association: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**; 43: 18-27, 1994.
- TEDDER TF, INAOKI M, SATO S. The CD19-CD21 complex regulate signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. **Immunity**; 6:107-108, 1997.
- THOMPSON JS, BIXLER SA, QIAN F, VORA K, SCOTT ML, CACHERO TG, HESSION C, SCHNEIDER P, SIZING ID, MULLEN C, STRAUCH K, ZAFARI M, BENJAMIN CD, TSCHOPP J, BROWNING JL, AMBROSE C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. **Science**; 293:2108-2114, 2001.
- THOMPSON JS, SCHNEIDER P, KALLED SL, WANG L, LEFEVRE EA, CACHERO TG, MACKAY F, BIXLER SA, ZAFARI M, LIU ZY, WOODCOCK SA, QIAN F, BATTEN M, MADRY C, RICHARD Y, BENJAMIN CD, BROWNING JL, TSAPIS A, TSCHOPP J, AMBROSE C. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. **The Journal of Experimental Medicine**; 192:129-135, 2000.
- TODD JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. **BioEssays**; 21:164-174, 1999.
- TOMER Y, CONCEPCION E, GREENBERG DA. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. **Thyroid**; 12(12):1129-35, 2002.
- van KOOTEN C, BANCHEREAU J. CD40-CD40 ligand. **Journal of Leukocyte Biology**; 67(1):2-17, 2000.

- WARREN SJP, LIN MS, GIUDICE GJ, HOFFMANN RG, HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI EA, SANTOS V, DIAZ LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**; 343: 23-30, 2000.
- WHEELER GN, PARKER AE, THOMAS CL, ATALIOTIS P, POYNTER D, ARNEMANN J, RUTMAN AJ. Desmosomal glycoprotein DGI, a component of intercellular desmosome junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 88:4796-4800, 1991.
- WILLETT WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. **Science**; 296:695-698, 2002.
- WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**; 19:251-253, 1955.
- WUCHERPFENNIG KW, STROMINGER JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell**; 80:695-705, 1995.
- XU S, LAM KP. B cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. **Molecular Cell Biology**; 21:4067-4074, 2001.
- XUE W, HASHIMOTO K, TOIY. Functional involvement of urokinase-type plasminogen activator receptor in pemphigus acantolysis. **Journal of Cutaneous Pathology**; 25:469-474, 1998.
- YAN M, MARSTERS AS, GREWAL IS, WANG H, ASHKENAZI A, DIXIT VM. Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. **Nature Immunology**; 1:37-41, 2000.
- YELLIN MJ, SIPPEL K, INGHIRAMI G, COVEY LR, LEE JJ, SINNING J, CLARK EA, CHESS L, LEDERMAN S. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. **The Journal of Immunology**; 152(2):598-608, 1994.
- ZHANG J, ROSCHKE V, BAKER KP, WANG Z, ALARCÓN GS, FESSLER BJ, BASTIAN H, KIMBERLY RP, ZHOU T. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Immunology**; 166:6-10, 2001.